



HAL
open science

Biosynthèse des lipides du lait et mécanismes de régulation par des facteurs génétiques ou environnementaux Etude de la Stomatine

Christelle Cebo, Morgane Bordessoules

► To cite this version:

Christelle Cebo, Morgane Bordessoules. Biosynthèse des lipides du lait et mécanismes de régulation par des facteurs génétiques ou environnementaux Etude de la Stomatine. Biochimie [q-bio.BM]. 2016. hal-02954908

HAL Id: hal-02954908

<https://hal.inrae.fr/hal-02954908>

Submitted on 1 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Rapport de stage :

**Biosynthèse des lipides du lait et mécanismes de régulation
par des facteurs génétiques ou environnementaux**
Etude de la Stomatine



Institut National de la Recherche Agronomique,
Génétique Animale et Biologie Intégrative,
Equipe Génomique Fonctionnelle et Physiologie
de la Glande Mammaire (GFP-GM)
Domaine de Vilvert, bâtiment 440, bureau 63

Directeur : Fabienne Le Provost
Maître de stage : Christelle CEBO
Professeur tuteur : Mme Sallen
Date de stage : 04/01/2016 au 26/02/2016

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce rapport.

*Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à la directrice de l'unité **GFP-GM**, **Fabienne Le Provost**, qui m'a permis d'effectuer mon stage de première et deuxième année de BTS Biotechnologies au sein de son équipe.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement mon maître de stage, **Mme Christelle CEBO**, pour son accueil, le temps passé ensemble et le partage de son expertise au quotidien. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance pour sa confiance et son soutien tout au long du stage.*

*Un grand merci à toute **l'équipe GFP-GM** pour leur gentillesse, leur esprit d'équipe et leurs précieux conseils.*

*Ainsi **Mr Nicolas BRUN** qui m'a accompagné lors de nombreuses manipulations.*

Je tiens également à exprimer ma sympathie aux personnes que j'ai rencontrées grâce à ce stage.

*Enfin, je tiens à remercier mon professeur tuteur, **Mme SALLEN**, pour s'être déplacée et être venue me voir durant le stage.*

ABREVIATION :

GFP-GM : Génomique **F**onctionnelle et **P**hysiologie de la **G**lande **M**ammaire

INRA : Institut **N**ational de **R**echerche **A**gronomique

GABI : Génétique **A**nimale et **B**iologie **I**ntégrative

UMR : Unité **M**ixte de **R**echerche

CEM : Cellule **E**pithéliale **M**ammaire

GL : Gouttelette **L**ipidique

PCR: Réaction de **P**olymérisation en **C**haîne ou **P**olymerase **C**hain **R**eaction

TBE: Tris **B**orate **E**DTA

BET: Bromure d'**E**thidium

dNTP: desoxy**N**ucléotide**T**ri**P**hosphate

ADN: Acide **D**ésoxyribo**N**ucléique

cDNA : complementary **D**esoxyribo**N**ucleique **A**cid

SVF : Sérum de **V**eau **F**œtal

DMEM : Dulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium

DMSO: Di**M**éthyl**S**ulf**O**xyde

PBS : Phosphate **B**uffered **S**aline ou **T**ampon **P**hosphate **S**alin

CO₂ : di**O**xyde de **C**arbone

mM : milli**M**olaire

mL : milli**L**itre

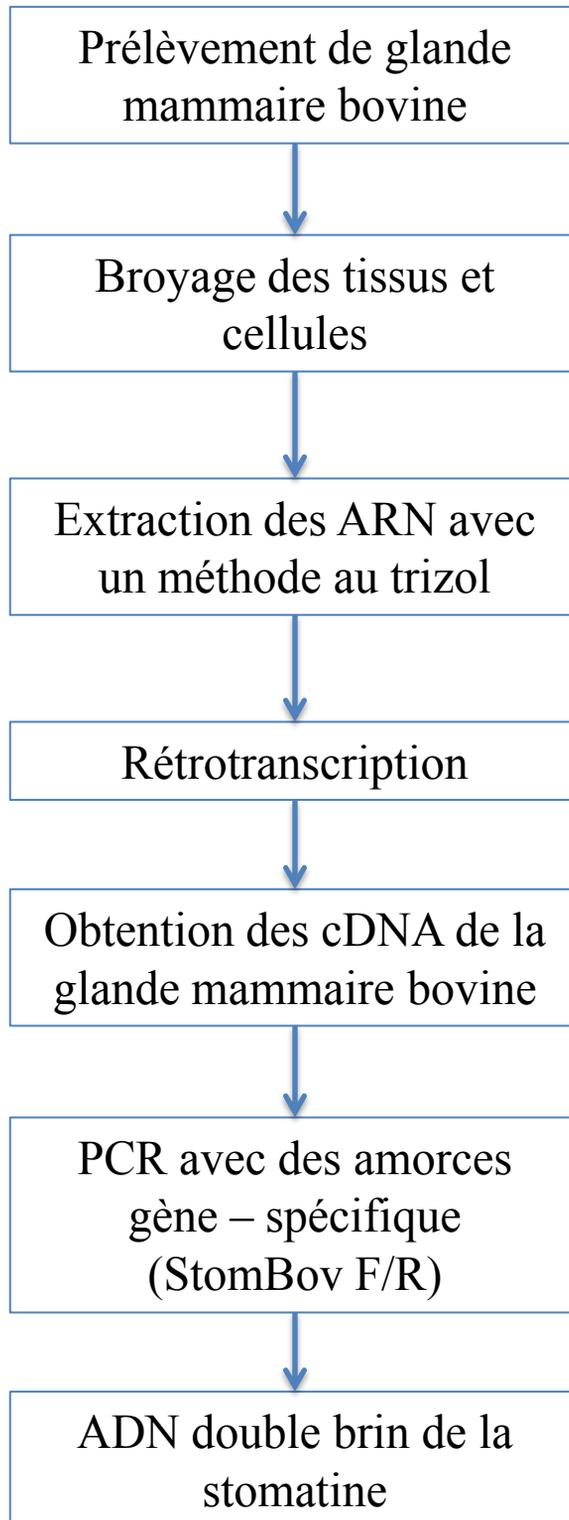
μL : micro**L**itre

Sommaire

Introduction :	1
PARTIE 1 : <i>présentation du laboratoire</i>	2
I- L’Institut National de Recherche Agronomique	2
1) Origines de l’INRA (figure n°2)	2
2) Le personnel et son recrutement	2
3) Travail et salaires	2
4) Hygiène et sécurité	3
II- Centre de Jouy en Josas	4
1) Présentation du centre (figure n°4)	4
2) Unité GABI (figure n°5)	4
3) Equipements	6
4) Financement	6
PARTIE 2 : <i>présentation générale du projet</i>	7
I- La glande mammaire	7
1) Description générale	7
2) Les cellules épithéliales (figure n°7)	7
3) Production et sécrétion du lait (figure n°8)	7
II- Explication du projet	8
1) Les objectifs à long terme du projet	8
2) Données scientifiques préalables	8
3) Objectifs à valider durant le 2 ^{ème} stage	9
PARTIE 3 : <i>présentation des manipulations entreprises</i>	10
I- Clonage moléculaire	10
1) Principe	10
2) Création d’un insert	10
3) Création d’un vecteur plasmidique	11
4) Clonage du cDNA de la Stomatine dans le vecteur pEGFP-C1	12
II- Validation des clones	13
1) Séquençage (protocole III - 5)	13
2) Explication des résultats de séquençage	14
3) Validation des clones « positifs »	14
4) Amplification des clones positifs (figure n°26)	14

III- Transfection d'ADN plasmidique dans des cellules de mammifère.....	15
1) Préparations préliminaires.....	15
2) Principe (figure n°29).....	16
3) Résultats et interprétations	16
Conclusion scientifique :	18
Conclusion personnelle :	19
ANNEXE :	20
I- Préparation de l'insert pour le clonage	20
1) Préparation du mix de PCR :	20
2) Paramètre de la PCR :	20
3) Vérification sur gel :.....	20
4) Amorce utilisé pour la PCR.....	20
5) Extraction sur gel.....	21
II- Protocole : amplification bactérienne.....	21
1) Préparation d'une préculture (sous PSM).....	21
2) Amplification de la préculture.....	21
III- Clonage du cDNA de la Stomatine dans pEGFP-C1.....	21
1) Restriction enzymatique	21
2) Ligature	22
3) Transformation	22
4) Prélèvement des colonies	23
5) Envoi au séquençage	23
IV- Préparation des clones pour la transfection.....	23
1) Minipréparation : préparation d'ADN plasmidique venant d'une culture bactérienne	23
2) Midipréparation : purification de plasmide	24
V- Culture cellulaire	24
1) Mise en culture	24
2) Décollement des cellules adhérentes	25
VI- Protocole de transfection Cos 7 avec Turbofect (R0531_Thermo scientific)	25
1) Préparation des différents mix.....	25
2) Protocole de transfection	26
Bibliographie :	27
Logiciel utilisé :	27
ABSTRACT :	28

Figure n°1 : Récupération du cDNA de la Stomatine



Introduction :

Pour mettre en pratique les différentes techniques étudiées en cours théorique et valider ma deuxième année de préparation du Brevet de Technicien Supérieur Biotechnologies à l'Ecole Nationale de Chimie Physique et Biologie, ENCPB, j'ai effectué un stage en laboratoire de recherche. J'ai donc passé huit semaines au sein de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) dans l'équipe GFP-GM, Génomique Fonctionnelle et Physiologie de la Glande Mammaire. Cette équipe fait partie de l'unité GABI, Génétique Animale et Biologie Intégrative et elle est dirigée par Fabienne Le Provost, Directrice de Recherches INRA.

Tous les chercheurs de cette équipe s'intéressent à la glande mammaire ; certains étudient les impacts de l'environnement sur cet organe alors que d'autres étudient les modifications épigénétiques induites dans divers contextes. Une autre partie de l'équipe approfondit les recherches sur les gènes d'intérêt non-codants (les microARNs), tandis que la chercheuse avec qui j'ai réalisé mon stage pratique étudie les mécanismes de biosynthèse des lipides du lait dans les cellules épithéliales mammaires.

C.Cebo a observé que le lait de chèvre moins gras contient plus de stomatine, une protéine associée aux lipides du lait. Les gouttelettes lipidiques, éléments figurant dans la matière grasse du lait, sont également plus petites dans le lait moins gras que dans le lait contenant plus de matière grasse.

Durant mon premier et mon deuxième stage au sein de cette équipe, j'ai travaillé sur le même projet : l'étude de la stomatine. Le but de ce projet est d'étudier le rôle de la sérine en position 244 de la protéine (Ser244) dans la fonction biologique de la stomatine.

Lors de mon premier stage, nous avons pu valider des amorces nucléotidiques afin d'amplifier le cDNA de la stomatine bovine pour son intégration ultérieure dans un vecteur d'expression de cellules de mammifères, le plasmide pEGFP-C1. Les manipulations entreprises nous ont également permis de valider les cellules COS-7 comme un modèle d'étude des gouttelettes lipidiques. De plus, nous disposons d'un anticorps primaire reconnaissant la stomatine humaine. Cet anticorps reconnaît la stomatine bovine que nous voulions surexprimer dans notre modèle cellulaire. L'ensemble de nos résultats nous ont permis de valider les cellules COS-7 comme un modèle d'étude pertinent des gouttelettes lipidiques en général et de la stomatine en particulier.

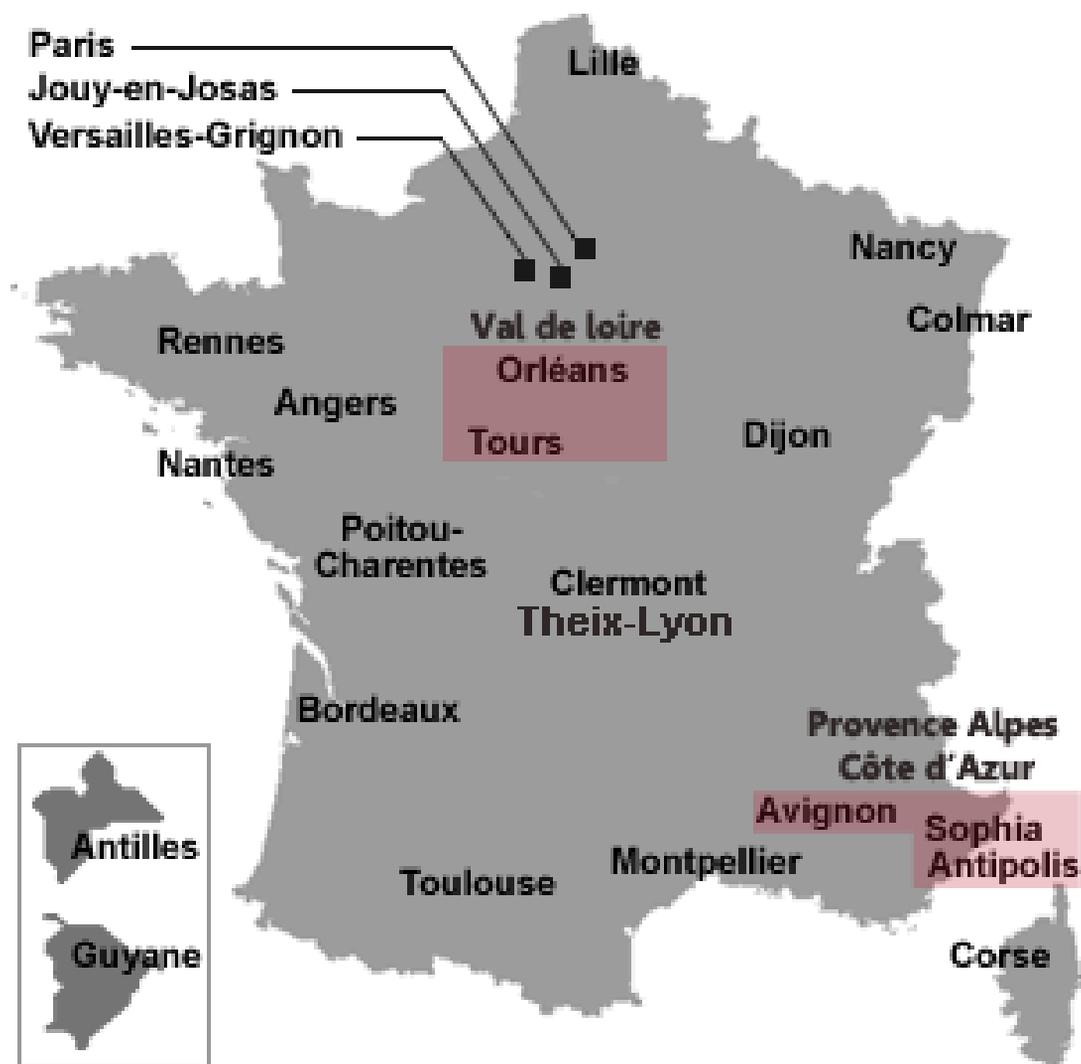
Entre les deux stages, C.CEBO et N.BRUN ont effectué un prélèvement de glande mammaire bovine, qu'ils ont ensuite broyé pour extraire les ARN (méthode au Trizol), pour ensuite réaliser une rétrotranscription afin d'obtenir les cDNA contenus dans la glande mammaire et amplifier l'ADN double brin de la stomatine (**Figure n°1**).

Les objectifs du stage pratique de deuxième année sont :

- de cloner la stomatine dans le vecteur d'expression de cellules de mammifères pEGFP, pour obtenir une protéine de fusion GFP-stomatine,
- de transférer le plasmide contenant la protéine de fusion GFP-stomatine dans des cellules COS-7, modèle préalablement validé pour notre étude des gouttelettes lipidiques,
- d'étudier la localisation de la protéine de fusion GFP-stomatine, avec ou sans stimulation des cellules, ainsi que l'effet produit par la surexpression de la stomatine dans les cellules COS-7.

Ce travail servira de base à la poursuite des travaux sur la stomatine dans le laboratoire, à savoir la mutation de certains acides aminés de la stomatine afin d'évaluer l'effet de cette mutation sur la fonction de la protéine dans notre modèle cellulaire.

Figure n°2 : Localisation des centres INRA en France



PARTIE 1 : *présentation du laboratoire*

I- L'Institut National de Recherche Agronomique

1) Origines de l'INRA (figure n°2)

L'INRA a été fondé en 1946 dans le contexte de la reconstruction nationale d'après-guerre et du projet de modernisation de l'agriculture française. L'INRA a accompagné depuis les mutations du monde agricole, des filières alimentaires et des territoires avec l'objectif de répondre aux attentes exprimées par la société.

L'INRA est un organisme français de recherche en agronomie placé sous le statut d'Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST), et sous la double tutelle du Ministère chargé de la Recherche et du Ministère chargé de l'Agriculture.

Premier institut de recherche agronomique en Europe, deuxième dans le monde, l'INRA mène des recherches finalisées pour une alimentation adaptée, pour un environnement préservé et pour une agriculture compétitive et durable.

2) Le personnel et son recrutement

L'INRA étant un établissement public, ses employés bénéficient du statut de fonctionnaire, ce qui signifie que tout licenciement de personnel ne peut être dû qu'à une faute qualifiée de « grave ».

Le recrutement est accessible par concours nationaux externes à tous les niveaux de diplômes, du certificat d'aptitudes professionnelles au doctorat, et par concours internes, permettant à chaque employé d'évoluer au sein des laboratoires tout au long de sa carrière.

L'institut recrute des post-doctorants, français ou étrangers, qui sont sélectionnés après avoir proposé un projet scientifique ou professionnel intéressant et cohérent.

Les différents statuts au sein de l'institut requièrent des qualifications particulières. Selon leurs qualifications, les postulants peuvent être employés en tant que techniciens de recherche, ingénieurs, chargés de recherche ou directeurs de recherche.

Chaque agent est évalué tous les deux ans et les chercheurs sont également évalués de manière approfondie tous les quatre ans sur les avancées de leur recherches.

3) Travail et salaires

La durée hebdomadaire de travail est de 38 heures sur cinq jours, mais elle peut varier selon chacun. Ce chiffre tient compte de la pause déjeuner accordée, qui est de 45 min. les horaires de travail de référence sont : 9h à 17h. Le personnel peut cependant avoir des horaires aménagés à sa convenance, entre 7 et 19 heures, à la condition que la durée de travail quotidienne ne dépasse pas les 10 heures, soit une durée de travail hebdomadaire de 38 heures. De plus, il est possible de travailler à temps partiel dans certaines conditions, notamment lors d'une naissance.

Concernant les congés payés, ils sont au nombre de 31 jours ouvrés par année civile (du 1^{er} janvier au 31 décembre) et doivent être pris avant le 31 décembre. Ceux-ci ne tiennent pas compte des réductions de temps de travail (RTT) qui sont au nombre de 12,5 jours par an pour une durée hebdomadaire de travail de 38 heures. Au total, chaque employé dispose donc de 44 jours de congés annuels, soit 8 semaines et 4 jours.

Figure n°3 : Tri des déchets



4) Hygiène et sécurité

a. Sensibilisation

Les règles et les consignes d'hygiène et de sécurité de l'INRA sont globalement les mêmes que tous les instituts de la fonction publique. Le directeur du laboratoire doit veiller à leur respect et est aidé pour cela par les « assistants de prévention » qui ont suivi une formation spécifique. De plus, chaque personne est sensibilisée à son arrivée dans l'institut au travers d'une documentation ainsi qu'une visite des laboratoires.

Chaque année, un bilan des accidents est effectué de façon à se positionner dans une démarche préventive et renforcer ou améliorer certaines mesures de sécurité. Les médecins présents dans le centre sont avertis des risques auxquels sont exposés les employés, de façon à pouvoir agir efficacement lors d'une intervention. Tout employé est suivi annuellement, par des prélèvements de sang et d'urines. Les personnels manipulant la radioactivité ont un suivi plus particulier.

Chacun est responsable du matériel commun mis à disposition, mais son entretien est assuré par une personne en particulier, c'est à celle-ci qu'il faut indiquer tout dysfonctionnement observé. Tous les ans des entreprises extérieures viennent vérifier le bon fonctionnement des machines de PCR, des centrifugeuses ainsi que la conformité des balances et des pipettes automatiques.

b. Tri des déchets (figure n°3)

Des consignes strictes ont été mises en place quant à l'élimination des différents types de déchets générés par les expériences en laboratoire. Les déchets sont ainsi triés et stockés dans des récipients adaptés selon la nature du danger qu'ils représentent. Ces récipients sont régulièrement collectés par un prestataire externe pour être détruits ou traités selon leur toxicité.

c. Protection

La manipulation en laboratoire nécessite dans tous les cas le port de la blouse et des gants, que ce soit pour la protection de la peau ou pour éviter de contaminer les produits utilisés. L'utilisation de lunettes est fortement recommandée (risques de projections).

Chaque agent possède trois blouses pour éviter les contaminations : une pour la culture cellulaire (elle restera dans le laboratoire de culture cellulaire), une pour la bactériologie (elle restera en bactériologie), et une dernière utilisée lors des manipulations de biochimie. Un ramassage hebdomadaire des blouses est effectué pour leur nettoyage par un prestataire externe.

Pour pénétrer dans l'animalerie (souris ou lapin) de risque biologique de niveau 2, il faut se vêtir d'une blouse qui n'est réservée qu'à cet effet, d'une charlotte et de sur-chaussures. Ces précautions servent aussi bien à ne pas faire entrer de contaminants dans l'animalerie que pour se protéger d'éventuels pathogènes dont les animaux pourraient être porteurs.

Figure n°4 : Plan du centre de l'INRA de Jouy en Josas

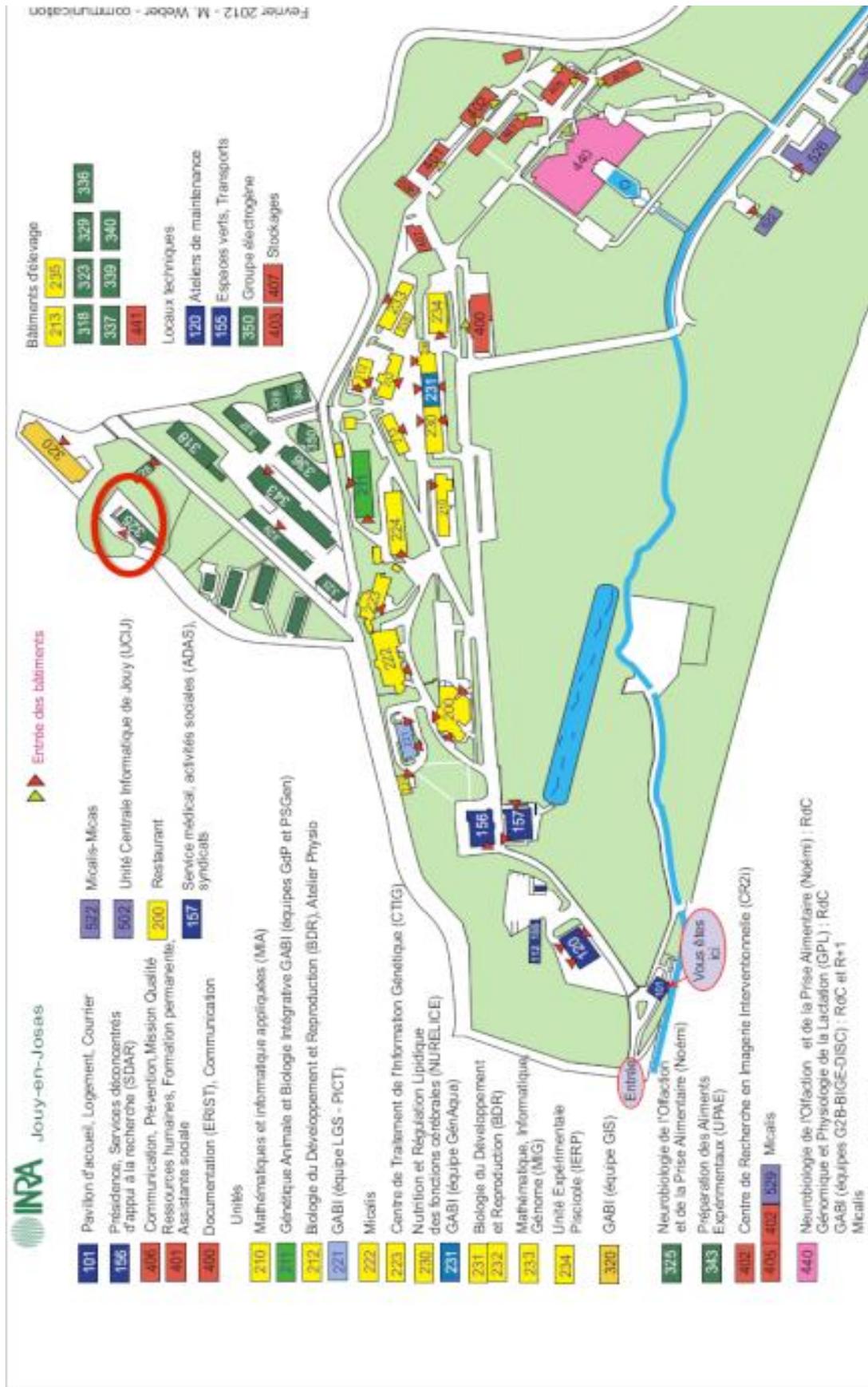
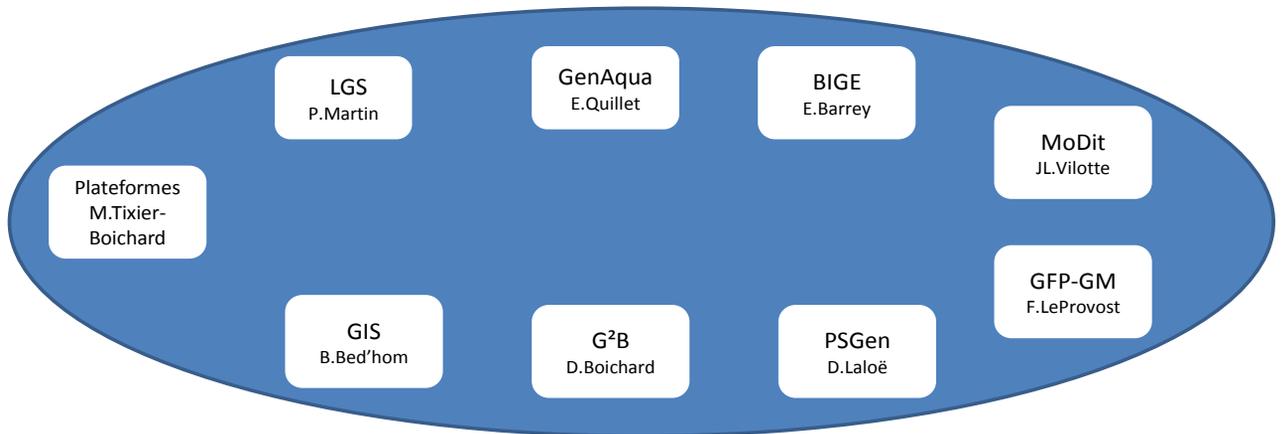


Figure n°5 : Organisation de GABI



Equipes de recherche, plateformes et partenaires



PSGen	Population, Statistique, Génome
G ² B	Génétique et Génomique Bovines
GenAqua	Génétique et Aquaculture
BIGE	Biologie Intégrative et Génétique Equine
MoDit	Modèles animaux et Différenciation Tissulaire
GFP-GM	Génomique Fonctionnelle et Physiologique de la Glande Mammaire
LGS	Lait, Génome et Santé
GIS	Génétique Immunité, Santé

II- Centre de Jouy en Josas

1) Présentation du centre (figure n°4)

Le centre de Jouy-en-Josas est situé à environ 20 km au sud-ouest de Paris, et 7 km de Versailles, emploie 1 440 personnes, plus de 900 agents titulaires de l'INRA soit 10 % du personnel de l'INRA, 580 agents non-titulaires INRA (détachés d'autres organismes de la recherche et de l'enseignement supérieur, en contrat à durée déterminée, stagiaires), 150 doctorants, 50 post-doctorants, 26 enseignants-chercheurs, 40 thèses par an.

Les recherches du Centre de Jouy-en-Josas portent sur la génétique et la physiologie animale, la microbiologie, la biologie intégrative et les mathématiques appliquées, dans des domaines ayant trait à l'agronomie, la nutrition humaine et la santé.

2) Unité GABI (figure n°5)

a. Origines

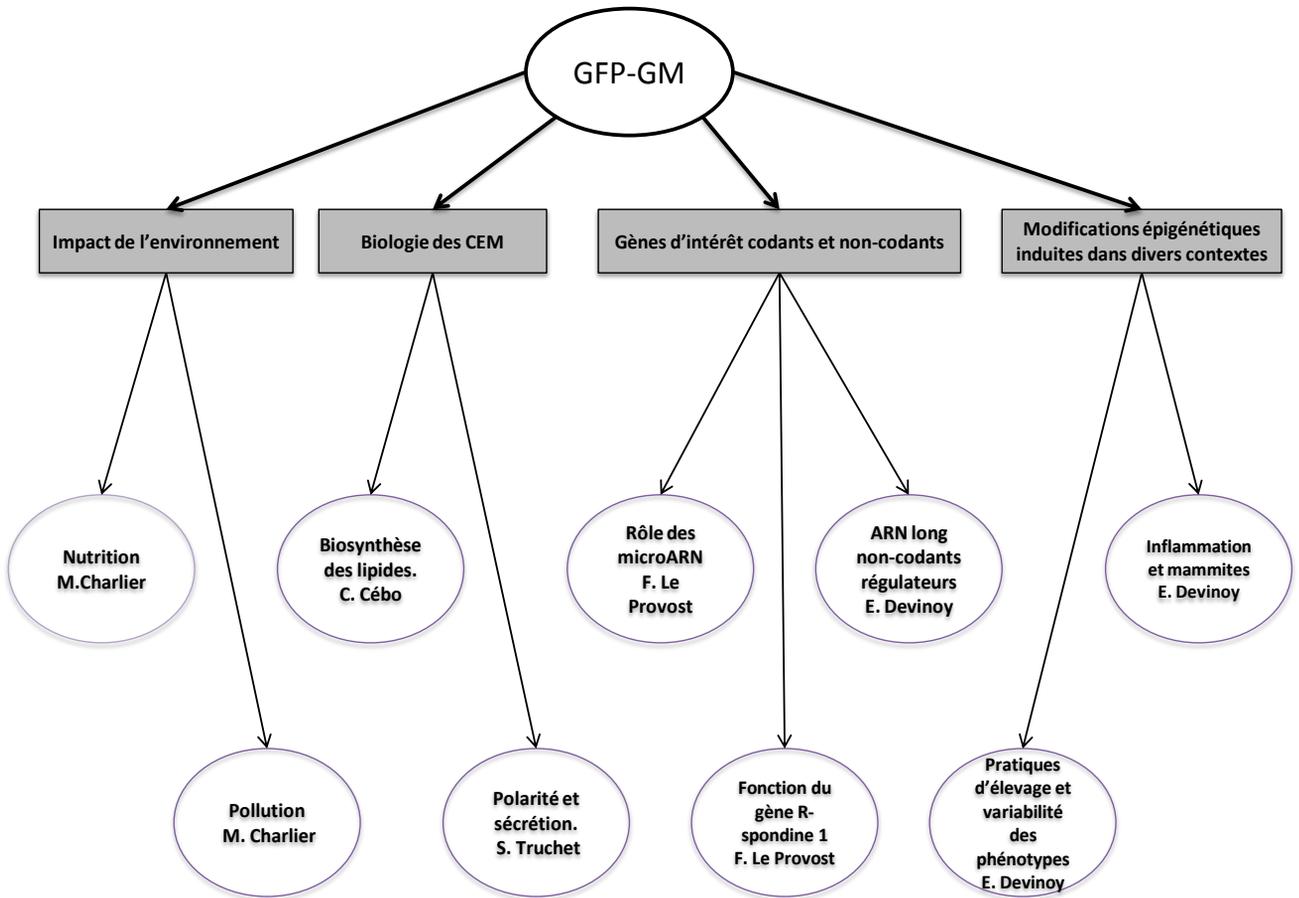
Créé le 1^{er} janvier 2009, l'Unité Mixte de Recherche en Génétique Animale et Biologie Intégrative (UMR 1313 GABI) est placée sous la tutelle conjointe de l'INRA et d'AgroParisTech. Elle est dirigée par C.ROGEL-GAILLARD et regroupe près de 200 chercheurs, enseignants chercheurs, ingénieurs, techniciens et étudiants (issus de l'INRA, AgroParisTech, CEA (Centre d'Energie Atomique) ou ENVA (Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort) et de plusieurs organismes techniques (Idele (Institut de l'élevage), IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Equitation), UNCEIA (Union National des Coopératives d'élevage et d'insémination Animale)). Cette unité fait partie du département de Génétique Animale, dirigé par D.MILAN, dont les missions essentielles sont de contribuer au progrès des connaissances en génétique des animaux domestiques et de développer les outils d'amélioration génétique des populations d'animaux de rente.

b. Thématiques

L'unité GABI est une unité mixte de recherche qui a pour but de comprendre et exploiter la variabilité génétique pour un élevage performant et durable pour cela l'unité :

- étudie les polymorphismes de séquences dans les populations d'élevage (étude de la plasticité des génomes, recherche de traces de sélection),
- analyse les systèmes de régulations des génomes (cartographie fonctionnelle) et des interactions génétiques,
- décrypte les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement et la différenciation de la glande mammaire, du muscle et de l'os et de la réponse immunitaire
- modélise les processus biologiques responsables d'un phénotype particulier par reconstruction de réseaux de régulation (gènes, ARN, protéines, métabolites),
- analyse l'architecture génétique de caractères d'intérêt (robustesse, adaptation, santé, qualité des produits) jusqu'à l'identification de mutation causales,
- développe les méthodes et les outils de prédiction de la valeur génétique des reproducteurs sur la base de l'information génomique (sélection génomique),
- contribue à la définition des objectifs de sélection et développe les méthodes d'optimisation des programmes d'amélioration génétique du futur,
- gère la diversité génétique des populations animales d'élevage et naturelles en relation avec leur environnement.

Figure n°6 : Organigramme des travaux de l'équipe Génomique Fonctionnelle et Physiologique de la Glande Mammaire



c. Description de l'unité de recherche

L'unité de recherches GABI est structurée en huit équipes de recherche et une équipe plateforme. Son fonctionnement s'appuie sur des services communs composés de deux pôles (gestion-administration et informatique) et de cellules transversales (qualité, prévention, achats, bioinformatique, communication, etc.).

L'équipe BIGE (Biologie Intégrative et Génétique Equine) développe des méthodes permettant d'améliorer les populations équines sur le plan des aptitudes sportives comme sur celui de la santé. L'équipe produit également des connaissances nouvelles sur les mécanismes génomiques qui sous-tendent les performances sportives et les pathologies qui limitent l'usage des chevaux.

L'équipe GIS (Génétique Immunité, Santé) travaille sur la génétique de la santé et de l'adaptation, en développant des recherches à visée agronomique ou biomédicales chez le porc, la poule et le lapin.

L'équipe PSGen (Population, Statistique, Génome) conduit des recherches méthodologiques en génétique de populations et en bio statistiques, tout en ancrant ces recherches dans des problématiques concrètes et des études appliquées. L'équipe est structurée par trois axes la génétique des populations et les ressources génétiques, les bio statistiques, l'expérimentation animale et les lignées expérimentales.

Les travaux de l'équipe GenAqua (Génétique et Aquaculture) ont pour objectif la description et l'exploitation des ressources génétiques aquacoles à des fins d'élevage ou de repeuplement. Elle analyse l'architecture génétique des caractères importants en élevage ou en milieu naturel, et étudie les modalités d'introduction de ces caractères dans les schémas de sélections adaptés aux contraintes biologiques et socio-économiques de la filière piscicole française.

La mission principale de l'équipe G²B (Génétique et Génomique Bovines) est d'apporter des connaissances et des outils contribuant par la génétique à la durabilité de la production bovine dans ses dimensions économiques, sociales et environnementales.

L'équipe MoDiT (Modèles animaux et Différenciation Tissulaire) vise à analyser la fonction biologique de gènes impliqués dans le développement et la différenciation tissulaire et/ou récemment trouvés associés à des défauts du développement précoce pouvant affecter le tissu nerveux.

L'équipe GFP-GM (Génomique Fonctionnelle et Physiologique de la Glande Mammaire) étudie les mécanismes biologiques impliqués lors du développement mammaire et du fonctionnement des cellules épithéliales mammaires, lors des variations observées sous l'influence de facteurs environnementaux (nutrition, élevage, pollution). (**Figure n°6**)

L'équipe LGS (Lait, Génome et Santé) est centrée sur le génome et la fonction mammaire, avec pour principal objectif d'évaluer et d'exploiter l'impact de la variabilité du génome sur le fonctionnement de l'épithélium alvéolaire mammaire et les conséquences qui en découlent sur la composition du lait, sa valeur santé et ses aptitudes technologiques.

3) Equipements

Le bâtiment « biotechnologies » (bâtiment 440) regroupe plusieurs unités. Mon équipe d'accueil partage les locaux avec l'équipe MoDIT. Les principales techniques utilisées par l'équipe sont associées à la biologie moléculaire, essentiellement pour les techniques du Western blot, de PCR ou de qPCR et à la biologie cellulaire. Chaque chercheur possède son propre laboratoire et son propre équipement :

- Vortex, centrifugeuse
- Réfrigérateur à 4°C et un congélateur à -20°C
- Sorbonne

Dans la partie des locaux réservés aux bureaux, les différents membres de l'équipe possèdent un ordinateur avec des logiciels classiques : Word, Excel, PowerPoint... et des logiciels spécialisés pour l'imagerie : Image J et Photoshop pour le traitement des images...

De plus, l'équipe partage des salles communes mises à la disposition pour toutes les équipes du département, telles que :

- des chambres froides à 4°C et à -20°C, les congélateurs à -80°C,
- des étuves à 37 °C,
- un imageur western blot,
- des chambres avec plaques UV et imageur à LED pour la révélation des gels d'agarose,
- des salles de culture cellulaire avec des hottes à flux laminaires, une centrifugeuse, une étuve, un microscope inversé...,
- des pièces de pesées avec une balance de précision (jusqu'au 100^{ème} de milligramme), des stocks de poudres et de solution, un pH-mètre...,
- une salle de bactériologie et une de culture cellulaire, deux microscopes à fluorescence,

Enfin, l'équipe possède des animaux dans deux animaleries :

- Au bâtiment 441-IERP (installation expérimentale rongeurs et poissons)
- Au bâtiment d'élevage-336 (lapins)

4) Financement

Le laboratoire dispose de crédits alloués par l'Etat (Subvention d'Etat), subvention qui dépend du nombre de chercheurs, doctorants et post-doctorants en exercice dans le laboratoire. C'est ce qu'on appelle la « part-chercheur » (1333 euros), crédit alloué par l'Etat à multiplier par le nombre de chercheurs dans l'équipe.

Toutefois, cette aide financière systématique n'est pas suffisante pour permettre au chercheur de financer son projet de recherche sur l'année ou de s'équiper de matériel coûteux (ex imageur Western blot, 23 k€). Les chercheurs doivent donc également répondre à des Appels à Projet (AAP) internes à l'INRA (ex : AAP Génétique Animale) ou externes à l'INRA (Agence Nationale de la Recherche (ANR) ou AAP européens. Le temps consacré à la recherche de financements ampute donc le temps pour la recherche scientifique proprement dite.

Pendant mon stage, les recherches de l'équipe étaient financées par 3 ANR (MilkChEST, EPAPP, et Epigrani) ainsi que par des petits financements INRA (AAP du Département Grabbit).

Figure n°7 : Cellules épithéliales mammaires (CEM)

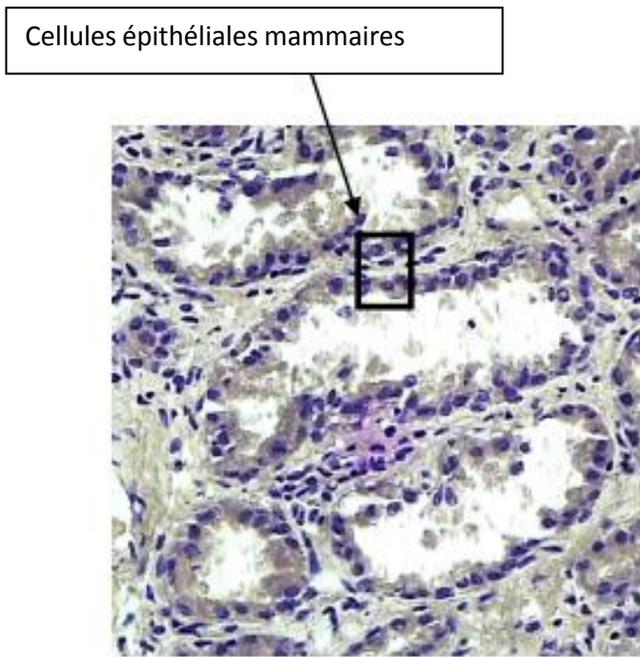
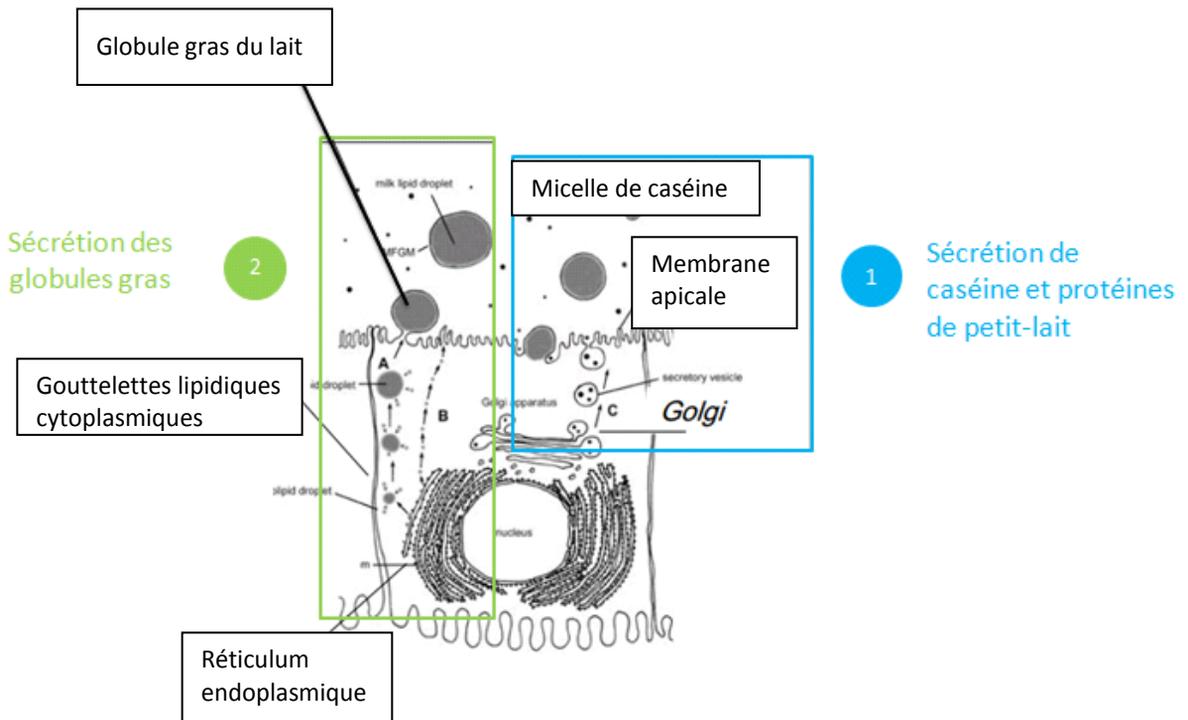


Figure n°8 : Sécrétion du lait et des globules gras



PARTIE 2 : *présentation générale du projet*

I- La glande mammaire

1) Description générale

La glande mammaire est un organe sécréteur des mammifères dont la fonction principale est de produire le lait permettant l'alimentation des petits après leur naissance. Le nombre de glandes varie selon les espèces et elles sont réparties de manière symétrique sur la partie ventrale des femelles. Chacune de ces entités fonctionne de manière indépendante. Cet organe complexe est constitué de cellules épithéliales, d'un stroma contenant des adipocytes, des fibroblastes, des terminaisons nerveuses, du tissu conjonctif ainsi que de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques.

La glande mammaire est dite exocrine puisque les cellules épithéliales mammaires (CEMs) sécrètent le lait vers le milieu extérieur. Ces cellules sont organisées en alvéoles ou acini, eux-mêmes groupés en lobules formant des lobes. Ces structures débouchent sur des canaux collecteurs arrivant au mamelon chez les primates et les rongeurs ou au niveau d'une citerne chez les bovins, ovins et caprins.

2) Les cellules épithéliales (figure n°7)

La CEM est responsable de la production et de la sécrétion de lait, c'est une cellule différenciée et polarisée. Le pôle basal repose sur une matrice extracellulaire et c'est à ce niveau qu'ont lieu les échanges entre la cellule épithéliale et le milieu intérieur (sang et lymph). C'est également à ce niveau que les cellules épithéliales et myoépithéliales (cellules qui entourent les CEM) entrent en contact étroit. Le pôle apical, donnant sur la lumière de l'acinus où est sécrété le lait, présente de nombreuses microvillosités. L'étanchéité de l'épithélium formé par la monocouche de CEMs est assurée par la présence de jonctions serrées entre ces dernières. Une fois l'épithélium complètement différencié, aucun échange n'est plus possible entre le milieu intérieur et la lumière de l'acinus. De plus, dans les cellules, les transports intracellulaires de matériel biologique ne sont pas équivalents vers la base de l'apex et sont dits asymétriques.

3) Production et sécrétion du lait (figure n°8)

Les protéines du lait sont synthétisées par la cellule épithéliale à partir des acides aminés apportés par les vaisseaux sanguins irriguant la glande mammaire. Cette synthèse débute par la traduction des ARN messagers codants des protéines au niveau du réticulum endoplasmique. Le polypeptide d'acides aminés va subir plusieurs modifications telles que le clivage du peptide signal et la N-glycosylation. Les protéines sont ensuite transportées dans l'appareil de Golgi, où elles subissent d'autres types de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la sulfatation. Au niveau du réseau trans-Golgien, les protéines matures sont triées dans différents types des vésicules selon leur destination finale dans la cellule. Les protéines du lait devant être sécrétées dans la lumière des acini, les vésicules les contenant sont acheminées vers l'apex par le biais des éléments du cytosquelette (microtubules et les filaments d'actine). Au niveau du pôle apical, la membrane des vésicules contenant les caséines va entrer en contact avec la membrane plasmique de la CEM. Ces membranes vont ensuite fusionner pour permettre la libération des protéines du lait dans la lumière de l'acinus : c'est le processus d'exocytose.

Les gouttelettes lipidiques (GLs) sont synthétisées par accumulation de lipides neutres entre les deux feuillettes de la membrane du réticulum endoplasmique puis transportées, entourées d'une monocouche de phospholipides, jusqu'à l'apex des CEMs. Les GLs sont sécrétées dans la lumière de l'acinus par un processus de bourgeonnement, et se retrouvent ainsi entourés de la membrane plasmique.

Figure n°11 : Organisation du gène de la stomatine

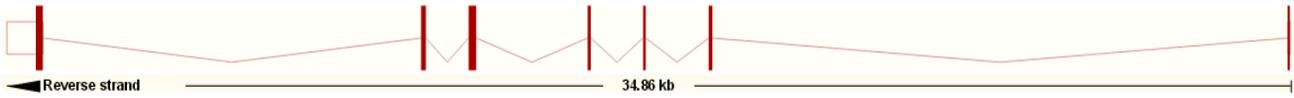


Figure n°12 : Récapitulatif des manipulations prévues pour le projet

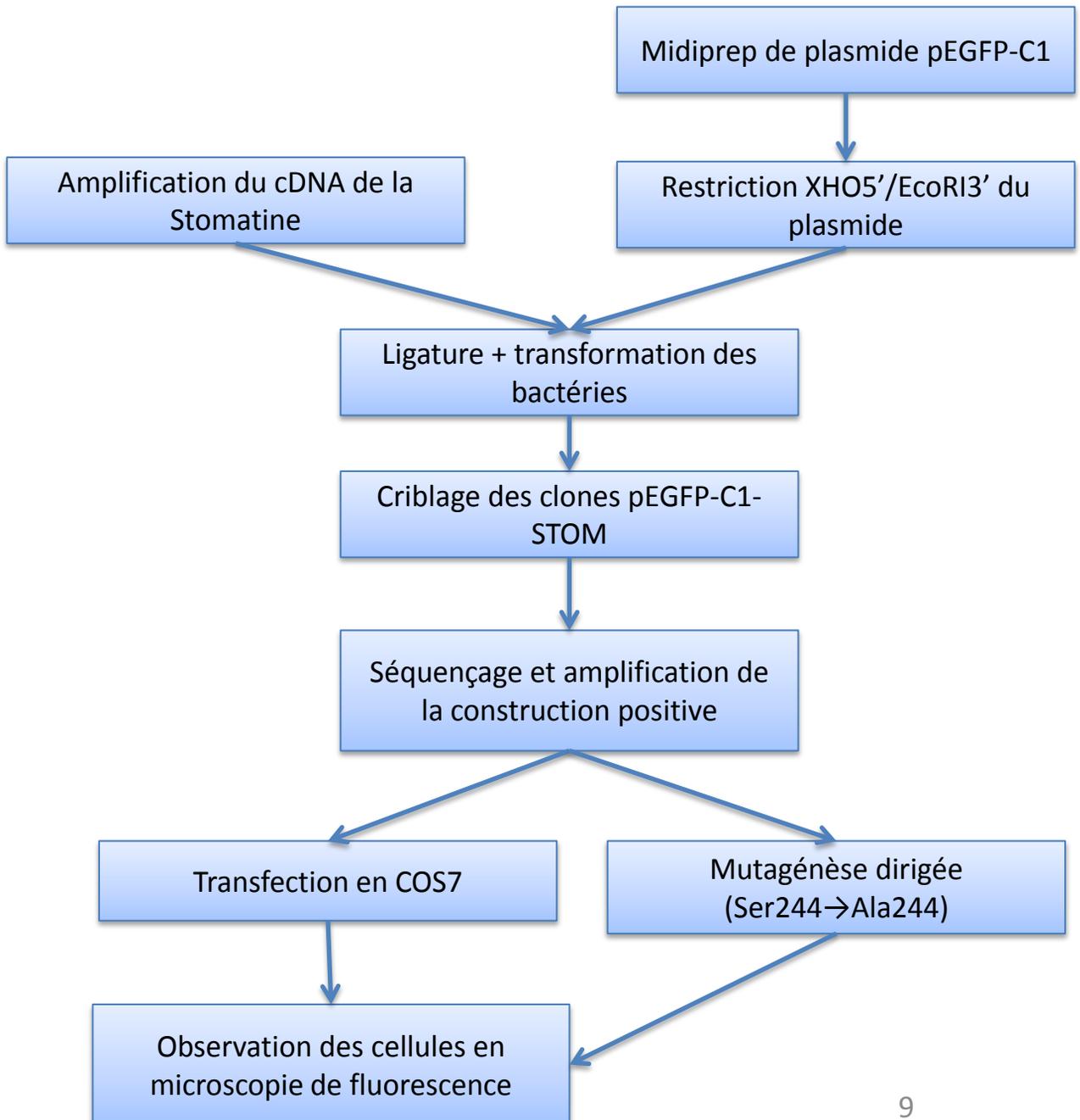
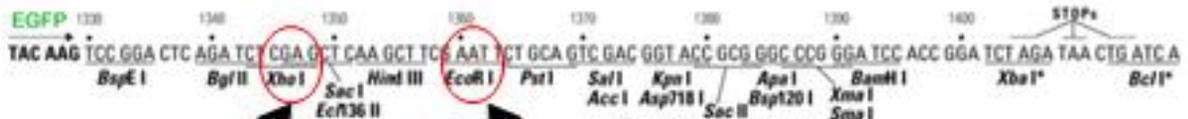
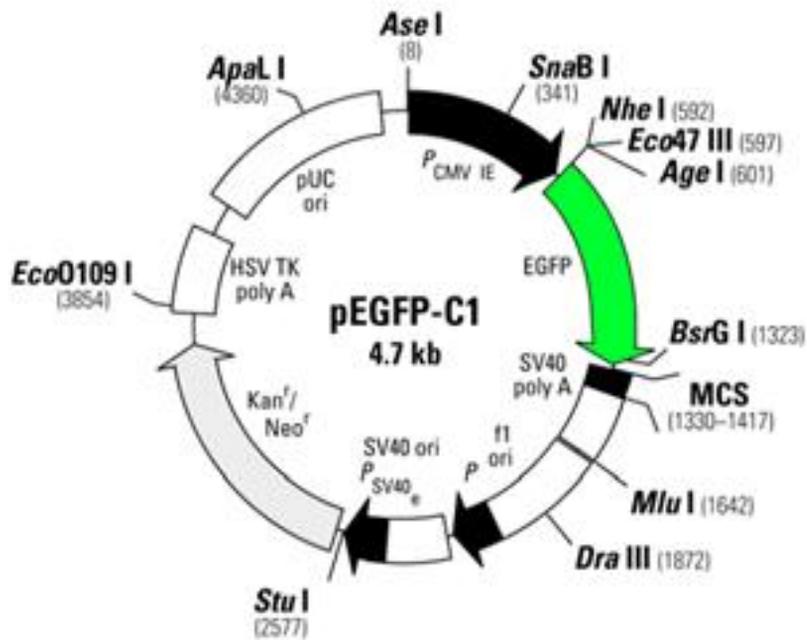
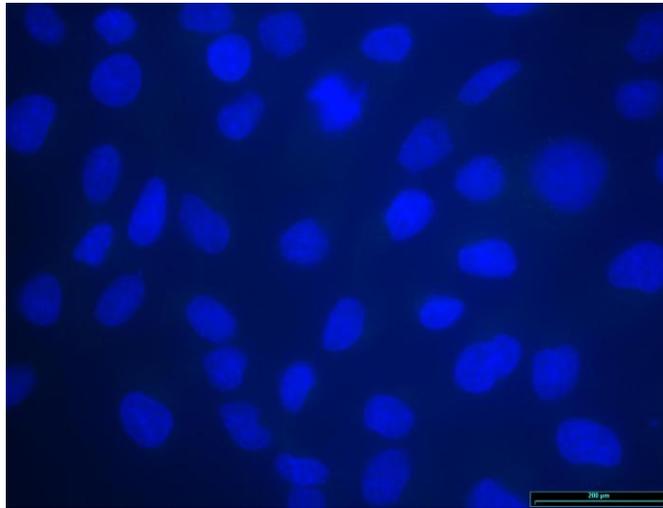


Figure n°13 : Carte du vecteur plasmidique pEGFP – C1 avec l’insert de la stomatine

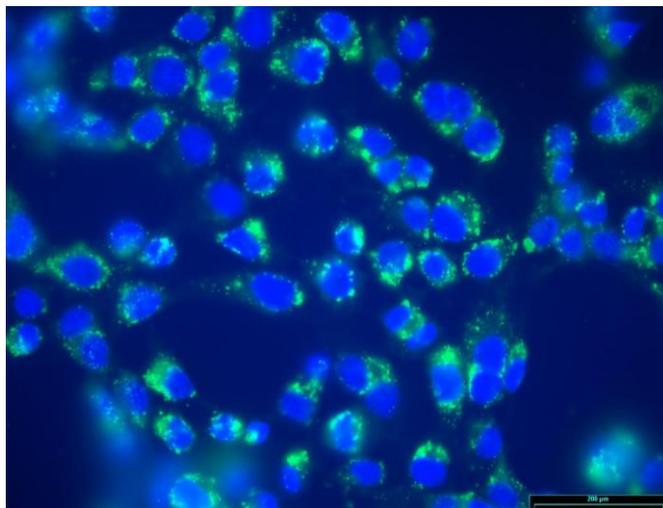


CDNA de la Stomatine

Figure n°14 : Observation microscopique des cellules COS-7 après stimulation par 300 μ M d'acide oléique



Cellules COS7 non stimulées dans un puits de 200000 cellules



Cellules COS7 stimulées dans un puits de 200000 cellules

II- Explication du projet

1) Les objectifs à long terme du projet

La cellule épithéliale mammaire (CEM) produit les lipides du lait par un mécanisme unique en biologie. La synthèse des triglycérides du lait est initiée au niveau du réticulum endoplasmique de la cellule épithéliale mammaire. Des gouttelettes lipidiques recouvertes de phospholipides membranaires ayant pour origine la monocouche lipidique du réticulum endoplasmique sont alors libérées dans le cytoplasme de la cellule. Les gouttelettes lipidiques vont fusionner et migrer vers le pôle apical de la CEM où elles vont se recouvrir progressivement d'une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique de la CEM pour être libérées sous la forme de globules gras (**figure n°9**), éléments figurant la matière grasse du lait.

On cherche à comprendre la fonction dans la biosynthèse des lipides du lait d'une protéine, la stomatine, une protéine mineure associée aux gouttelettes lipidiques. Le gène de la stomatine est composé de 7 exons (**figure n°11**) chez le bovin.

Les protéines des gouttelettes lipidiques peuvent, comme toutes les protéines, avoir des modifications post-traductionnelles. Ainsi, la stomatine présente quatre sites de phosphorylation chez la vache; Ser2, Thr10, Ser244 et Thr177 (**Figure n°10**). Lorsque l'on aligne les séquences primaires de la stomatine de l'homme, de la vache et de la souris, on constate que deux sites de phosphorylation sont conservés : Ser244 et Thr177. Ces sites de phosphorylation conservés induit l'hypothèse de l'existence d'une fonction biologique associée.

Le projet de recherche vise à étudier le rôle de la Ser244 dans la fonction biologique de la stomatine (**figure n°12**). Pour cela, nous nous proposons de transférer des cellules avec un plasmide sur-exprimant la stomatine bovine (**figure n°13**) et d'évaluer son effet sur les gouttelettes lipidiques (nombre, taille, composition en lipides et en protéines ...). La sérine en position 244 sera ensuite mutée en alanine. L'effet de cette mutation sur la fonction biologique de la stomatine sera ensuite évalué *in vitro*.

2) Données scientifiques préalables

Les amorces nucléotidiques ont été validées afin d'amplifier le cDNA de la stomatine bovine pour son intégration ultérieure dans un vecteur d'expression de cellules de mammifères, le plasmide pEGFP-C1. D'un autre côté, le plasmide d'expression a été préparé en large quantité pour y insérer le produit de PCR purifié (insert).

Les manipulations entreprises ont également permis de valider les cellules COS-7 comme un modèle d'étude des gouttelettes lipidiques. Les cellules présentent une très bonne réponse à la stimulation à l'acide oléique à une concentration de 150 μ M, si on en juge par la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques cytoplasmiques après stimulation (**figure n°14**).

Il existe un anticorps primaire reconnaissant la stomatine humaine. Cet anticorps reconnaît la stomatine bovine que nous voulons surexprimer dans notre modèle cellulaire, mais il fallait déterminer si cet anticorps reconnaissait aussi la protéine endogène, la stomatine exprimée par les cellules rénales de chimpanzé (COS-7) avant et après stimulation à l'acide oléique. Nous avons montré que l'anticorps anti-stomatine humaine reconnaissait aussi la stomatine d'un hominidé, le chimpanzé.

L'ensemble de ces résultats nous permet de valider les cellules COS-7 comme un modèle d'étude pertinent des gouttelettes lipidiques en général et de la stomatine en particulier.

3) Objectifs à valider durant le 2^{ème} stage

Le but de ce stage de deuxième année est d'amplifier le plasmide pEGFP-C1 contenant le cDNA de la stomatine et de le transfecter dans des cellules, préalablement validé pour cette étude, les cellules COS7 puis de muter certains acides aminés de la stomatine et évaluer cette mutation sur la fonction de la protéine dans notre modèle cellulaire.

PARTIE 3 : *présentation des manipulations entreprises*

I- Clonage moléculaire

1) Principe

Le clonage correspond à l'insertion d'un fragment d'ADN double brin dans un vecteur plasmidique et à l'amplification de cet ADN recombinant. Cette technique repose essentiellement sur la capacité des plasmides bactériens à se répliquer de manière autonome dans les bactéries ainsi que la faculté de croissance rapide des bactéries pour l'amplification des plasmides recombinants. La première étape de cette technique consiste donc à générer un vecteur recombinant en insérant une séquence d'intérêt ou insert dans un plasmide rendu linéaire par action d'enzymes de restriction. Pour cela, les extrémités de l'insert et du vecteur doivent être compatibles, c'est-à-dire qu'elles doivent être dans la même configuration (extrémités franches) ou posséder des séquences complémentaires (extrémités cohésives). De plus si les 2 extrémités du vecteur et celles de l'insert sont différentes l'une de l'autre et non complémentaires, cela nous permet de faire un clonage orienté. Les liaisons phosphodiester entre l'insert et le vecteur sont créées à l'aide d'une enzyme, la ligase lors d'une réaction de ligature. L'étape suivante consiste à faire pénétrer l'ADN recombinant ainsi produit dans des bactéries afin de l'amplifier lors de la transformation bactérienne. La ligature comme la transformation bactérienne ne sont pas totalement efficaces : des vecteurs peuvent ne pas posséder l'insert après la ligature et des bactéries peuvent ne pas contenir de vecteurs après la transformation. Il faut donc sélectionner les bactéries contenant un vecteur recombinant à l'aide de gène de résistance aux antibiotiques portés par le vecteur. Ainsi, seules les bactéries contenant le vecteur et donc résistantes à l'antibiotique seront capables de croître dans le milieu sélectif. Ceci ne permet cependant pas de savoir si le vecteur contient l'insert ou non. Il existe plusieurs approches possibles pour mettre en évidence la présence d'un vecteur recombinant, la manière la plus fiable est d'extraire l'insert du plasmide et de le séquencer pour pouvoir comparer sa répétabilité par rapport à la séquence de base.

On souhaite réaliser un clonage de la Stomatine bovine, la protéine que nous étudions, dans un vecteur (pEGFP - C1) exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) et capable, une fois induit dans des cellules eucaryotes, de générer des protéines chimériques GFP-Stomatine. La protéine de fusion GFP-stomatine sera fluorescente et on pourra ainsi suivre son expression dans les cellules COS-7 sans ajout de fluorochrome.

2) Création d'un insert

a) Préparation de l'insert pour le clonage

Nous avons amplifié l'insert par PCR. La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes: une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute).

Figure n°15 : Paramètre du cycle de PCR

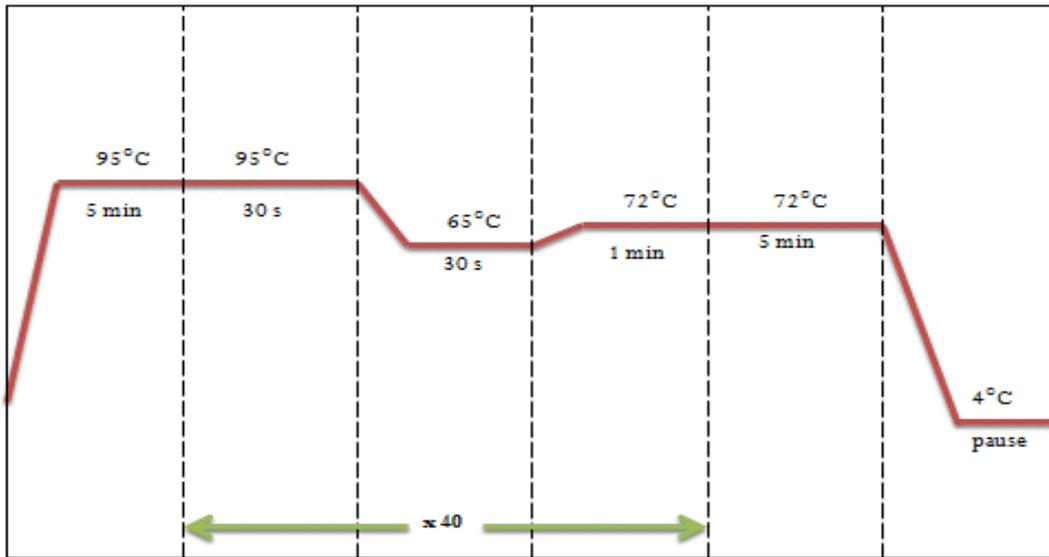


Figure n°16 : Visualisation sous imageur à LED d'un gel d'agarose 1% contenant du Gelgreen et dépôt des PCR des clones

Marqueurs de poids moléculaire utilisés lors de l'analyse des produits de PCR en gels d'agarose

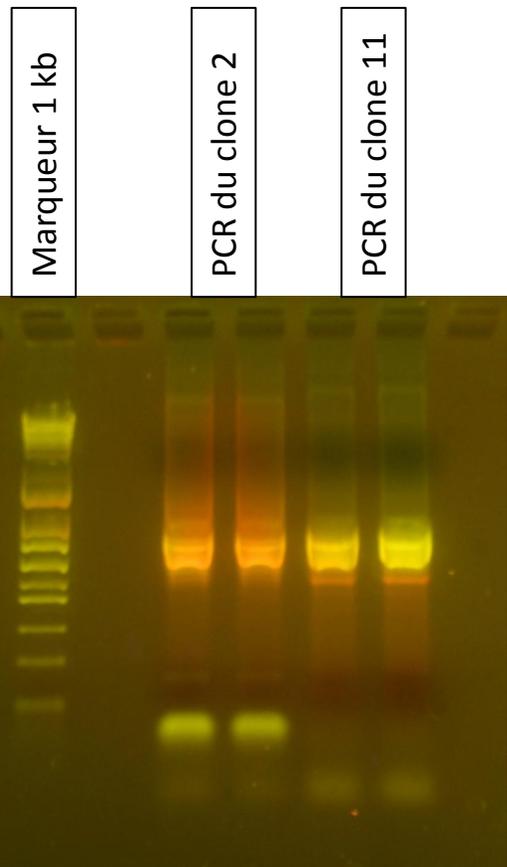
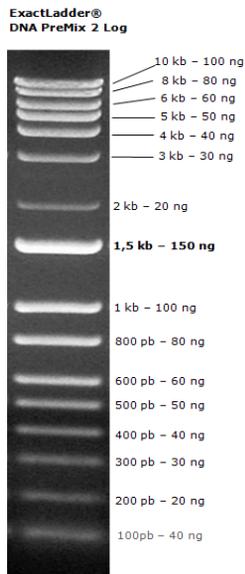


Figure n°17 : Protocole de purification sur gel

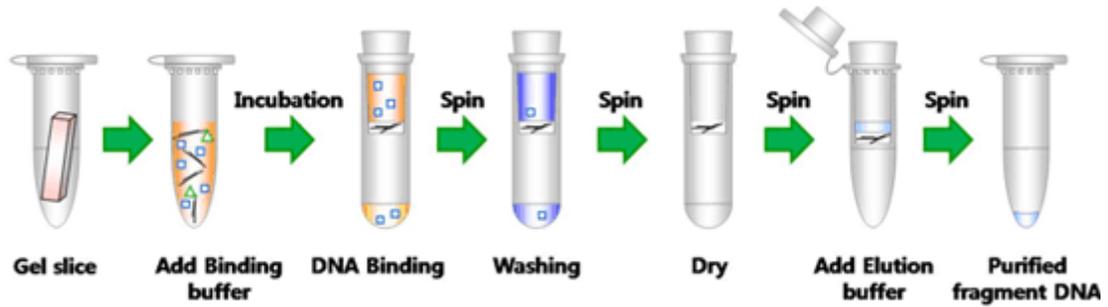


Figure n°18 : Carte de restriction du vecteur pEGFP-C1

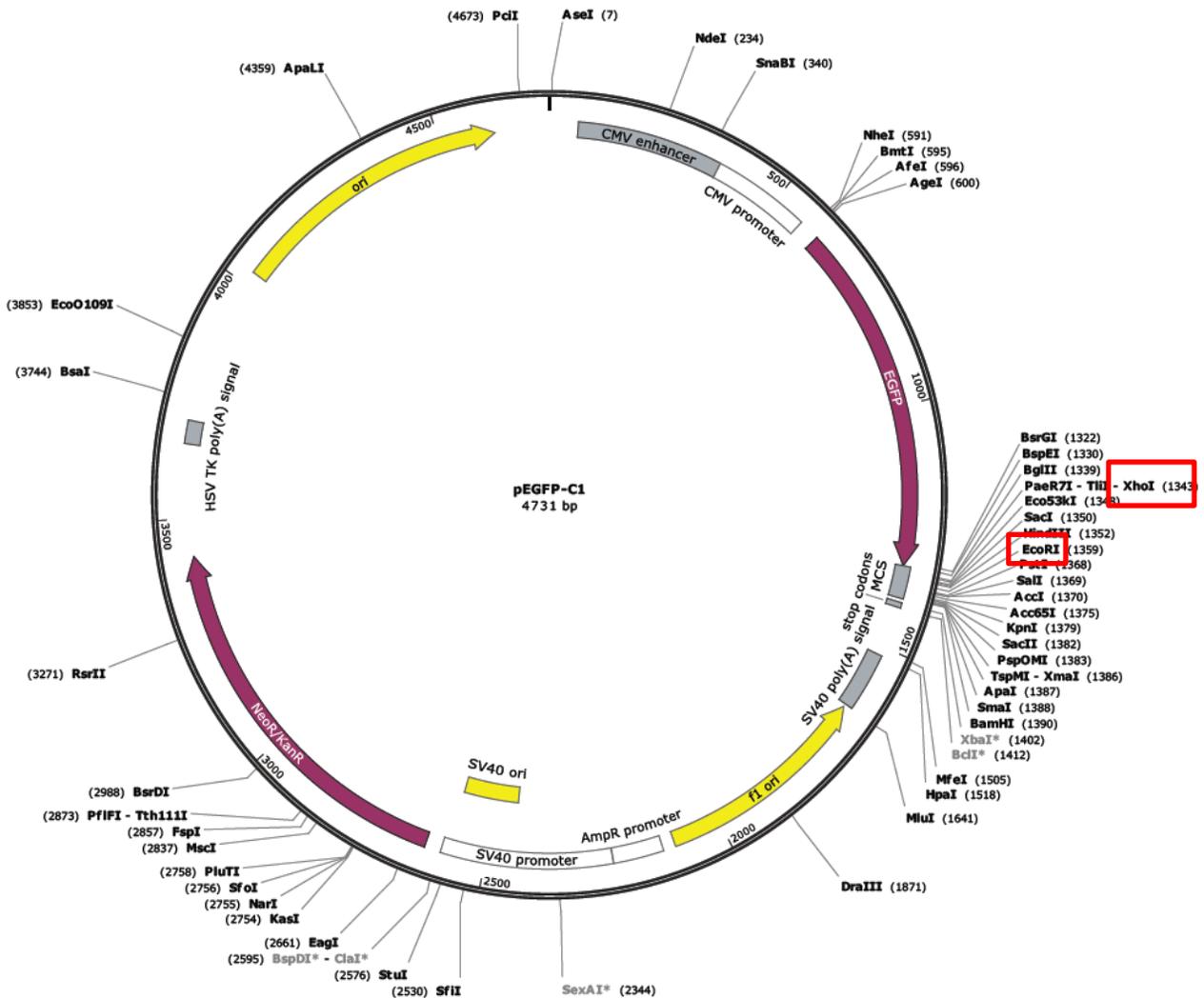
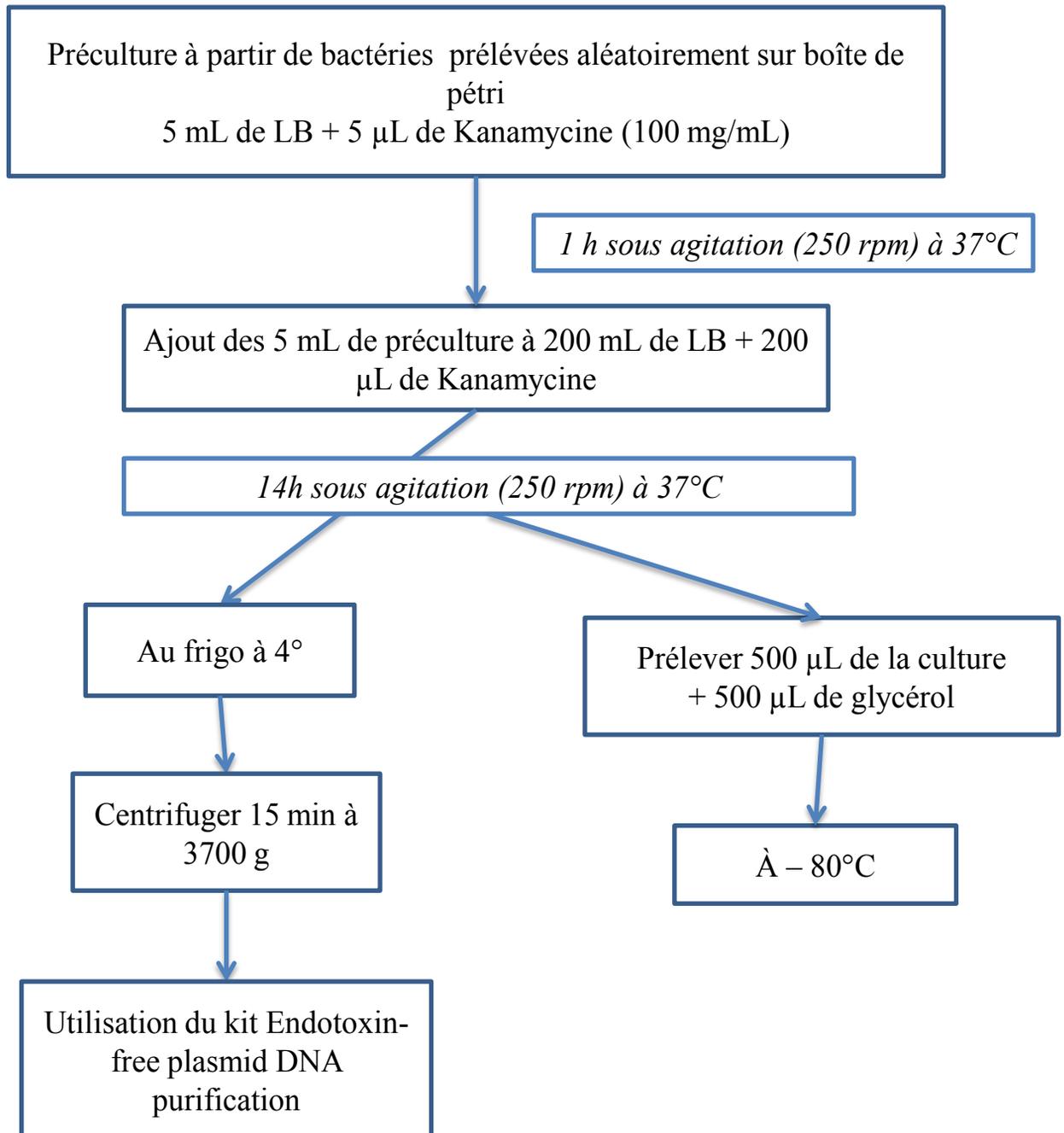


Figure n°19 : Amplification du vecteur plasmidique



Une fois le milieu réactionnel de la PCR réalisé (**protocole I - 1**), on ajoute l'enzyme, la Go Taq G2 flexi DNA polymerase, c'est une enzyme standard qui possède une activité 3'→ 5' exonucléase. La première étape consiste à chauffer 5 minutes à 95°C le mélange, ce qui permet la dénaturation initiale de l'ADN. Puis on met en place un cycle de PCR qui se répétera 40 fois (**protocole I - 2**) : 30s à 95°C, 30s à 65°C ce qui correspond à la température optimale d'hybridation spécifique des amorces de PCR, puis 1 min à 72°C c'est la durée d'extension de la réaction de PCR (1 minute par kilobase environ). Enfin pour l'étape d'élongation, on laisse 5 min à 72°C, puis on garde le produit de PCR à 4°C jusqu'à analyse en gel d'agarose. (**figure n°15**) et (**protocole I - 3**),

Des sites de restriction XhoI et EcoRI (**protocole I - 4**) ont été ajoutés aux amorces nucléotidiques d'amplification de la stomatine afin de permettre le clonage de l'insert ainsi amplifié dans le MCS (Multi Cloning Site, site de clonage multiple), qui contient également des sites de restriction uniques XhoI et EcoRI. Ces sites sont absents également de la séquence de la stomatine.

b) Purification sur gel de l'insert (**protocole I - 5**)

La purification sur gel est utilisée pour récupérer des fragments d'ADN après séparation par électrophorèse (**figure n°16**). La récupération d'ADN à partir d'un gel d'agarose inclue trois étapes de base: la fixation à une membrane, le lavage de la membrane et l'élution du produit d'intérêt. Il est communément accepté que l'ADN se lie à la silice en présence d'une haute concentration en sels. Après l'étape de fixation, la membrane est lavée. Le produit fixé est ensuite élué de la membrane en présence d'une faible concentration en sels (**figure n°17**). Afin de mesurer la quantité d'ADN obtenue par purification, il faut effectuer un dosage au Nanodrop, un micro-spectrophotomètre. Cette mesure nous permet aussi d'évaluer la présence de contaminants dans l'échantillon (rapport A280/A260 pour la détection de protéines par exemple).

3) Création d'un vecteur plasmidique

a) Description du vecteur (**figure n°18**)

Le vecteur pEGFP-C1 est un plasmide possédant un promoteur qui permettra l'expression de la protéine dans les cellules de mammifères (pCMV) ainsi que des gènes de résistance à des antibiotiques, la kanamycine et la néomycine. Ce plasmide possède une cassette GFP ou Green Fluorescent Protein. L'étiquette GFP associée à la stomatine nous permettra de la suivre dans les cellules lors de la transfection *in vitro*. Il possède aussi un site multiple de clonage (MCS) ce qui nous permettra d'y ajouter notre insert.

b) Amplification du vecteur (**figure n°19**)

Nous avons préalablement amplifié le vecteur plasmidique (pEGFP-C1) pour en avoir en quantité suffisante pour les manipulations ultérieures. (**protocole II**)

Pour la pré-culture on utilisera comme milieu du LB (Luria-Bertani) avec de la kanamycine. Les bactéries qui auront intégré le plasmide seront résistantes aux antibiotiques et pourront donc être sélectionnées sur boîte de pétri. Pour amplifier les colonies bactériennes d'intérêt, on pique un cure-dent dans la colonie bactérienne qu'on veut amplifier et on le trempe dans le milieu de pré-culture. On mettra à incuber une heure à 37°C sous agitation (250 rpm). Ensuite on verse les 5 ml de pré-culture dans 200 mL de LB + 200 µL de Kanamycine dans un erlen avec le bouchon dévissé. On incube la culture toute la nuit à 37°C sous agitation de 250 rpm. On extrait ensuite l'ADN plasmidique avec un kit d'extraction de type Midi Prep.

Figure n°20 : Principe de ligature

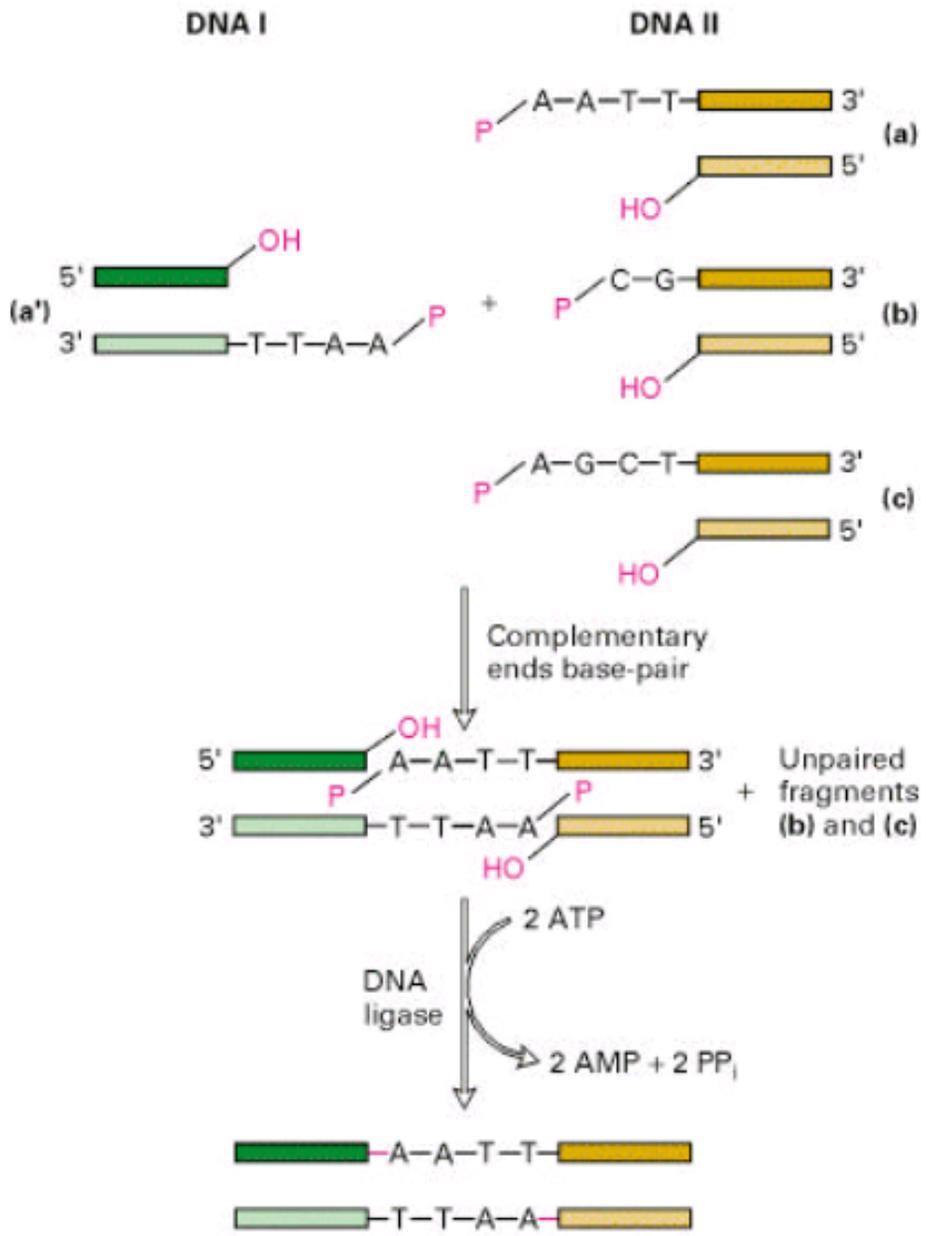
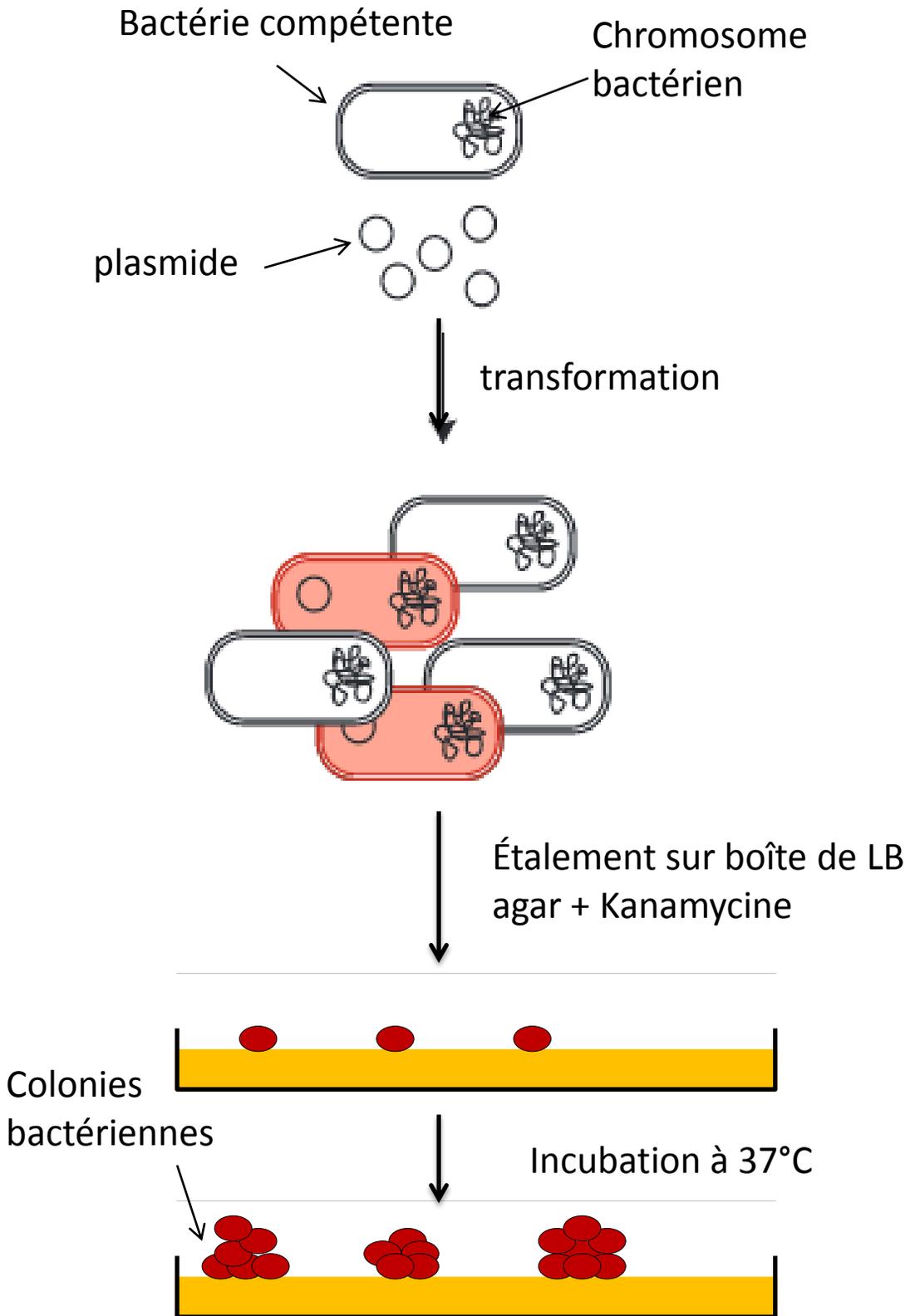


Figure n°21 : Principe de transformation



4) Clonage du cDNA de la Stomatine dans le vecteur pEGFP-C1

a) Restriction enzymatique (protocole III - 1)

Avant la ligation, il faut effectuer la restriction de l'insert et du vecteur pEGFP-C1 avec les enzymes de restrictions XhoI et EcoRI afin de créer des extrémités cohésives. Pour cela, nous allons préparer un mix contenant le plasmide ou l'insert purifié y ajouter les deux enzymes de restrictions ainsi qu'un tampon qui permet de tamponner le milieu réactionnel au pH optimal de l'enzyme. On ajoute également de la sérum albumine bovine dans le milieu réactionnel afin de stabiliser l'enzyme pendant la digestion de l'ADN et éviter l'adhésion de l'enzyme aux parois des tubes. Puis on laissera la réaction opérer 9 heures à 37°C.

Les produits de la réaction (l'insert et le plasmide pEGFP-C1 sous forme linéaire) seront purifiés avant la ligation. (**protocole III – 1**)

b) Ligation (figure n°20)

L'insert une fois purifié, on peut effectuer sa ligation au vecteur plasmidique avec une ligase (**protocole III - 2**) (la T4 ligase). Une ADN ligase est une enzyme capable de réparer l'ADN en créant de nouvelles liaisons covalentes entre deux morceaux d'ADN. Grâce à une molécule d'ATP qui leur fournit l'énergie nécessaire, les ADN ligases créent une liaison phosphodiester entre deux nucléotides, qu'ils appartiennent à des ADN simple brin ou double brin.

Afin d'avoir une bonne efficacité de ligation, il faut respecter la quantité d'insert à ajouter par rapport à 100 ng de vecteur, on peut déterminer cela grâce à la formule suivante:

$$\text{Quantité insert (ng)} = \frac{100 \text{ ng vecteur} * \text{taille de l'insert (pb)}}{\text{taille du vecteur (pb)}} * 3$$

c) Transformation (figure n°21)

La transformation est une technique qui permet de transférer l'ADN dans une cellule bactérienne. Pour que la transformation ait lieu, il faut que les bactéries soient aptes à recevoir cet ADN c'est-à-dire qu'elles soient « compétentes ». Pour devenir compétentes, la paroi des bactéries a été fragilisée par des sels calciques afin de faciliter l'introduction de l'ADN étranger par induction de micro-lésions de la paroi.

La transformation par choc thermique utilise un environnement riche en calcium (présence de chlorure de calcium) pour contrer la répulsion électrostatique entre l'ADN plasmidique et la membrane cellulaire bactérienne. Une augmentation soudaine en température crée des pores dans la membrane plasmique de la bactérie et autorise l'ADN plasmidique à entrer dans la cellule bactérienne. (**protocole III - 3**)

Les bactéries transformées sont étalées à différentes concentrations sur boîtes LB agar contenant de la kanamycine, l'antibiotique pour lequel les bactéries sont résistantes. On les laisse pousser une nuit à 37°C, ensuite on prélève au hasard un grand nombre de demi-colonies (que l'on identifie par des numéros ou des lettres pour une culture ultérieure éventuelle). (**protocole III - 4**)

Figure n°22 : Conditionnement des échantillons pour l'envoi en séquençage

Type d'échantillon	Poids (pb)	concentration	Volum e
ADN plasmidique	--	50-100 ng/μL	15 μL
Produits de PCR non purifié	150-300 pb	2 ng/μL	15 μL
Produits de PCR purifiés	300-1000 pb	5 ng/μL	15 μL
Produits de PCR purifiés	1000-3000 pb	10 ng/μL	15 μL
Produits de PCR purifiés	150-300 pb	4 ng/μL	15 μL
Produits de PCR non purifiés	300-1000 pb	10 ng/μL	15 μL
Produits de PCR non purifiés	1000-3000 pb	20 ng/μL	15 μL

On lyse les bactéries par chauffage à 95°C pendant 10 minutes puis on effectue une PCR sur chaque clone bactérien avec les amorces spécifiques de l'insert afin d'identifier les colonies positives. Pour cela, on dépose les produits de PCR sur colonies bactériennes sur un gel d'agarose contenant du BET. Après migration des fragments amplifiés, on observe sous UV la présence de l'insert à la taille attendue (855 pb dans le cas de la stomatine). Les produits de PCR des clones déclarés « positifs » sont envoyés pour séquençage à un prestataire externe (MWG Eurofins) (<https://www.eurofinsgenomics.eu/>).

II- Validation des clones

1) Séquençage (protocole III - 5)

Le séquençage est effectué par une entreprise extérieure à l'INRA (Eurofins genomics). L'envoi au séquençage se fait tous les matins avant 10h30 dans des tubes de 1.5 mL étiquetés. On peut envoyer à séquençer trois types de produits : de l'ADN plasmidique, des produits de PCR non purifiés et des produits de PCR purifiés. En fonction de leur degré de pureté et de la taille du produit, la concentration de l'échantillon varie (**figure n°22**). Il faut préalablement préparer ces échantillons à la bonne concentration, il est conseillé surestimer légèrement la quantité de matériel à doser afin d'avoir assez de matériel lors du séquençage et ainsi augmenter la fiabilité des résultats. Il faut aussi préparer les amorces utilisées lors du séquençage à une concentration de 10µM avec un volume minimal de 17 µL.

Nous avons envoyé à séquençer des clones « positifs », de façon à optimiser les résultats nous avons utilisé deux amorces une anti-sens (StomBov R) et une autre sens (StomBov F) de manière à séquençer notre ADN matrice dans les deux sens et ainsi réduire les erreurs de séquençage.

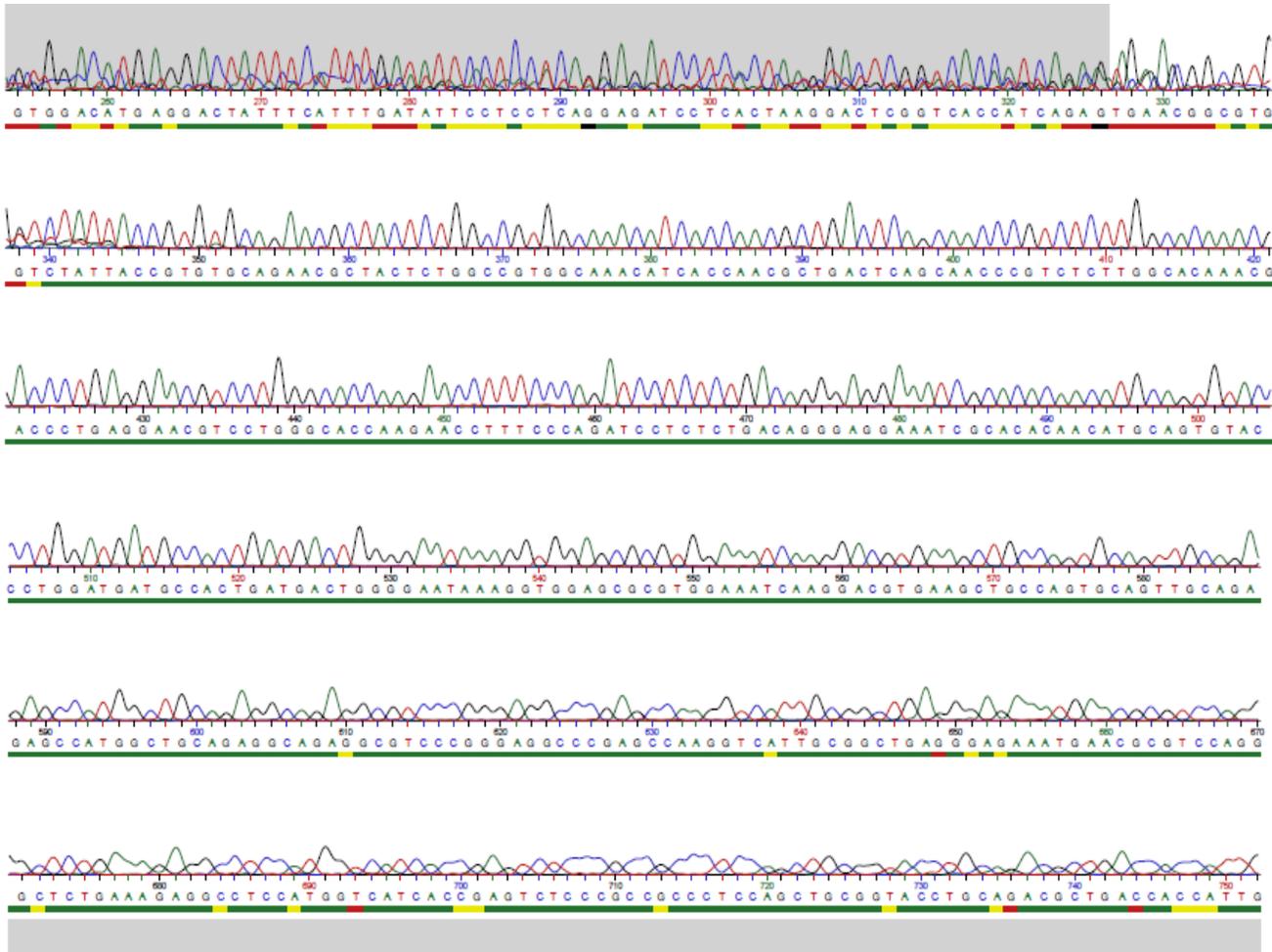
StomBov R est une amorce qui se fixe sur la fin de l'ADN matrice .

StomBov F est une amorce qui se fixe sur le début de l'ADN matrice .

Pour la transfection, on souhaite cloner la séquence de la Stomatine, on ne peut donc pas se permettre de transférer des clones avec des erreurs dans leurs séquences. Afin d'être sûre de transférer le bon clone, on la séquence de nouveau, mais cette fois avec des amorces différentes : EGFP F et StomBov R. EGFP F est une amorce qui se fixe sur la fin du gène de la GFP, sachant qu'il y a toujours des erreurs de séquençage au début, on est sûr d'avoir le début de notre ADN matrice correctement séquencé. Sachant que StomBov F se fixe sur le N-terminal de la séquence que l'on veut séquençer, on ne peut pas valider le début du séquençage, c'est pour cela qu'on a choisi de se fixer sur le C-terminal de la GFP avec EGFP-C1. On compare ensuite les résultats à la séquence de référence.

On s'est rendu compte que sur les deux clones que l'on avait sélectionné, un seul ne comportait aucune erreur (100% d'homologie de séquence avec la séquence de référence de la stomatine bovine). C'est donc la plasmide issu de ce clone que nous allons transférer dans les cellules COS7.

Figure n°23 : Chromatogramme du clone 11



Clip. 1 BQ 20 WL 10

Sequence: NL_PCR2_STOM-bov-F

Clipped length: 500
 Left clip: 324
 Right clip: 823
 Avg. qual. in clip.: 47.97

Samples: 12964
 Bases: 827
 Average spacing: 16.0
 Average quality >= 10: 192, 20: 111, 30: 488

Quality: 0 - 9	Black
10 - 19	Red
20 - 29	Yellow
>= 30	Green



Permet de connaitre
 la qualité du
 séquençage

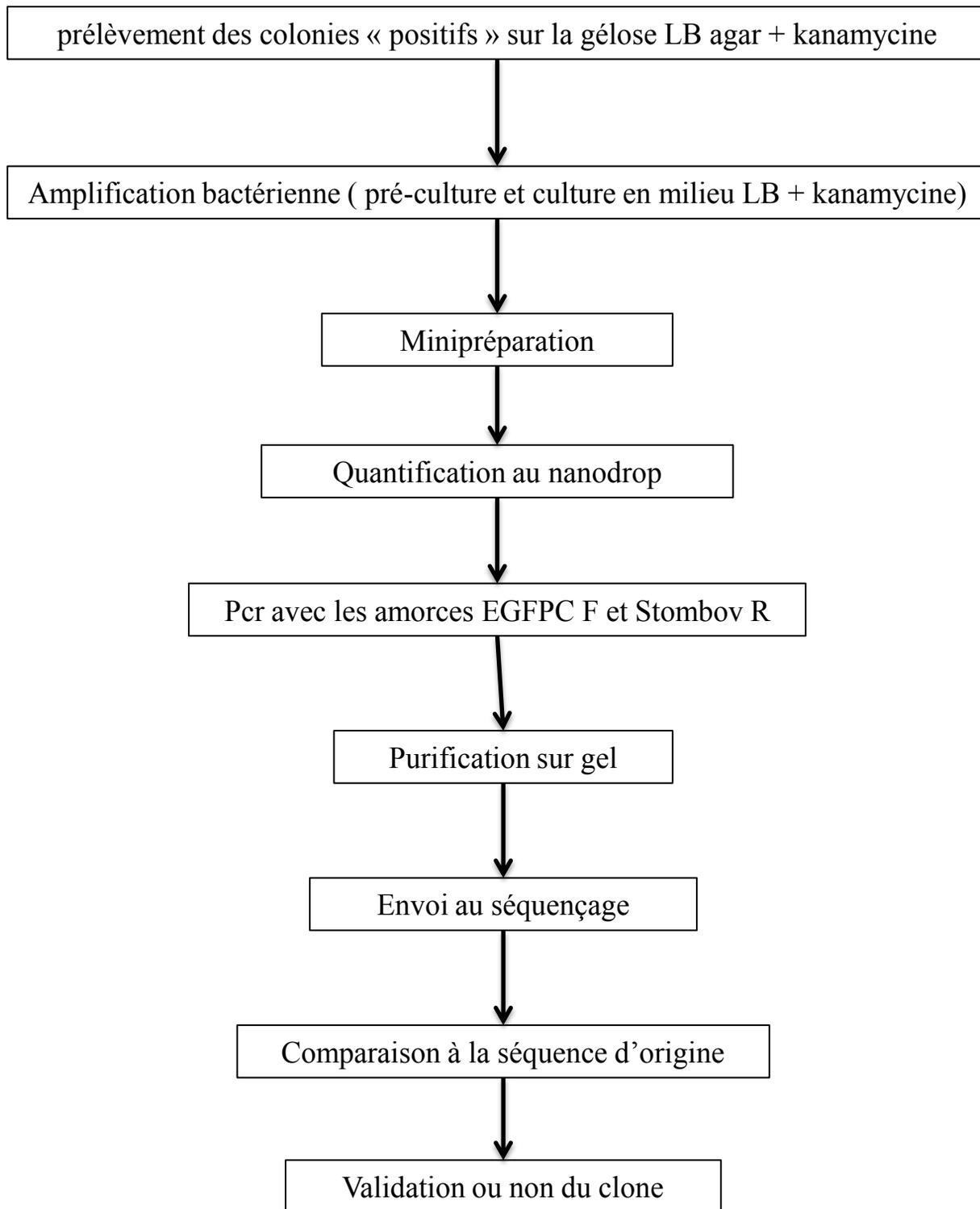
Figure n°24 : Séquence de la stomatine bovine

>tr|F1N2R1|F1N2R1_BOVIN Uncharacterized protein OS=Bos taurus
GN=STOM PE=4 SV=2
MSDKRPAVDTQARRLPDSFKDSPSTGLGVCGWILVAVSFLFTVITFPMSIWMCIKIIK
EYERAIIFRLGRILQGGAKGPGFLFFILPCTDSFIKVD MRTISFDIPPQEILTKDSVTISVD
GVVYYRVQ NATLAVANITNADSATRLLAQTTLRNVLGTKNLSQILSDREEIAHNMQ
CTLDDATDDWGIKVERVEIKDVKLPVQLQRAMAAEAEASREARAKVIAAEGEMN
ASRALKEASMV ITESPAALQLRYLQTLTTIAAEKNSTIIFPLPIDMLQAIMGPKQ

Figure n°25 : Comparaison d'un des clones avec la séquence de référence (CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment)

```
pcr11 -----  
tr|A8E4P3|A8E4P3_BOVIN MS DKRPAVDTQARRLPDSFKDSPSTGLGVCGWILVAVSFLFTVITFPVSIWMCIKIIKEY  
  
pcr11 -----NG  
tr|A8E4P3|A8E4P3_BOVIN ERAIIFRLGRILQGGAKGPGFLFFILPCTDSFIKVD MRTISFDIPPQEILTKDSVTISVDG  
: *  
  
pcr11 VVYYRVQ NATLAVANITNADSATRLLAQTTLRNVLGTKNLSQILSDREEIAHNMQCTLDD  
tr|A8E4P3|A8E4P3_BOVIN VVYYRVQ NATLAVANITNADSATRLLAQTTLRNVLGTKNLSQILSDREEIAHNMQCTLDD  
*****  
  
pcr11 ATDDWGIKVERVEIKDVKLPVQLQRAMAAEAEASREARAKVIAAEGEMNASRALKEASMV  
tr|A8E4P3|A8E4P3_BOVIN ATDDWGIKVERVEIKDVKLPVQLQRAMAAEAEASREARAKVIAAEGEMNASRALKEASMV  
*****  
  
pcr11 ITESPAALQLRYLQTLTTIAAEKNSTIIFPLPIDMLQAIMGPK-  
tr|A8E4P3|A8E4P3_BOVIN ITESPAALQLRYLQTLTTIAAEKNSTIIFPLPIDMLQAIMGPKQ  
*****
```

Figure n°26 : Préparation des clones positifs pour la transfection



2) Explication des résultats de séquençage

On reçoit les résultats sous 24 ou 48h sous forme de chromatogramme (pdf) et la séquence complète sous format FASTA.

Le chromatogramme permet de valider la qualité du séquençage. Chaque ligne du chromatogramme est composée de trois parties :

- sur la partie supérieure, il y a des pics qui correspondent à la détection de la fluorescence des fragments d'ADN obtenus. Un "pic" correspond donc à la détection d'un nucléotide donné dans la séquence : l'interprétation est donnée sous les courbes (En bleu : Adénine. En vert : Thymines. En jaune : Guanine. En rouge : Cytosine).
- Juste au-dessous, il y a la séquence des nucléotides.
- Tout en bas, il y a la fiabilité du séquençage. Si la bande est verte, la fiabilité est optimale, en jaune elle est moins bonne mais reste correcte tandis que si elle devient rouge ou noir, il y a un problème lors du séquençage (contamination de l'ADN par des protéines, des sels etc. ... ou il n'y a pas assez de matériel génétique) (**figure n°23**)

3) Validation des clones « positifs »

On souhaite transfecter le plasmide pEGFP-C1 codant pour la protéine de fusion GFP-Stomatine dans les cellules COS7, mais avant cela on doit valider qu'ils contiennent bien le cDNA de la Stomatine. Avec les résultats du séquençage, on a obtenu la séquence du clone, il faut donc le comparer à la séquence de référence de la Stomatine.

Pour cela, on récupère la séquence de référence de la Stomatine bovine (**figure n°24**) sur une banque de données ([Uniprot](http://www.uniprot.org)) et on traduit la séquence d'ADN du clone (grâce au logiciel libre de droits web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa) en protéine. A partir d'un logiciel d'alignement (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), on aligne la séquence du clone sur celle de la stomatine et on les compare. Afin qu'un clone soit validé, il faut que la séquence insérée soit en tout point identique à la séquence de référence. (**figure n°25**)

Sur les 8 clones que l'on a envoyé à séquencer plusieurs fois : 2 ne sont pas utilisables, il manque la fin du séquençage pour 3 autres et 2 semblent correspondre à la séquence initiale malgré une ou deux erreurs que l'on peut mettre sur le compte du séquençage.

4) Amplification des clones positifs (**figure n°26**)

Afin d'avoir plus de matériel génétique pour les expérimentations ultérieures en biologie cellulaire, on prélève les colonies que l'on a validées précédemment et on les amplifie par une pré-culture et une culture en milieu LB + kanamycine. On effectue ensuite une purification de l'ADN plasmidique à petite échelle avec un kit du commerce (MiniPrep). (**protocole IV - 1**)

La purification d'ADN plasmidique est une étape indispensable pour le clonage. On ajoute de l'ARNase afin de catalyser la dégradation des ARN, puis on ajoute un tampon de lyse pour faire éclater les membranes bactériennes et récupérer les plasmides à l'intérieur, on ajoute un autre tampon pour stopper l'effet du tampon de lyse. Après filtration du lysat pour éliminer les débris bactériens, on charge le lysat clarifié dans la colonne préalablement activée. La colonne est lavée par un tampon de lavage puis on centrifuge, on rejettera le liquide qui n'a pas été retenu par le filtre (flow-through). On élue ensuite le plasmide avec de l'eau ultrapure puis on quantifie le produit obtenu par spectrophotométrie (Nanodrop). On effectue ensuite une PCR sur le plasmide ainsi préparé avec les amorces spécifiques de l'insert (ici, la stomatine). On dépose ensuite le produit de PCR sur un gel d'agarose et on réalise un séquençage pour un dernier contrôle

Figure n°27 : Midipréparation

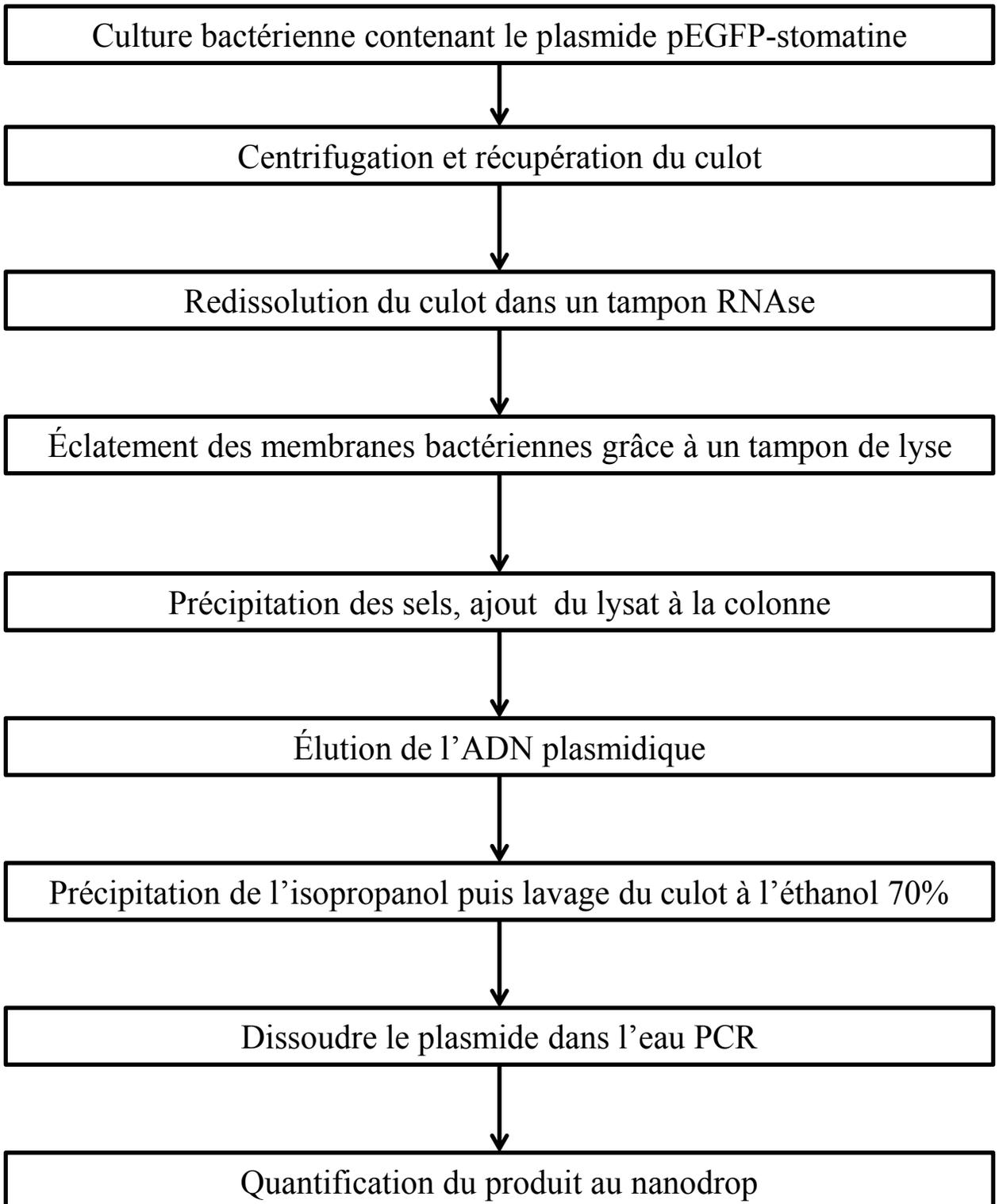
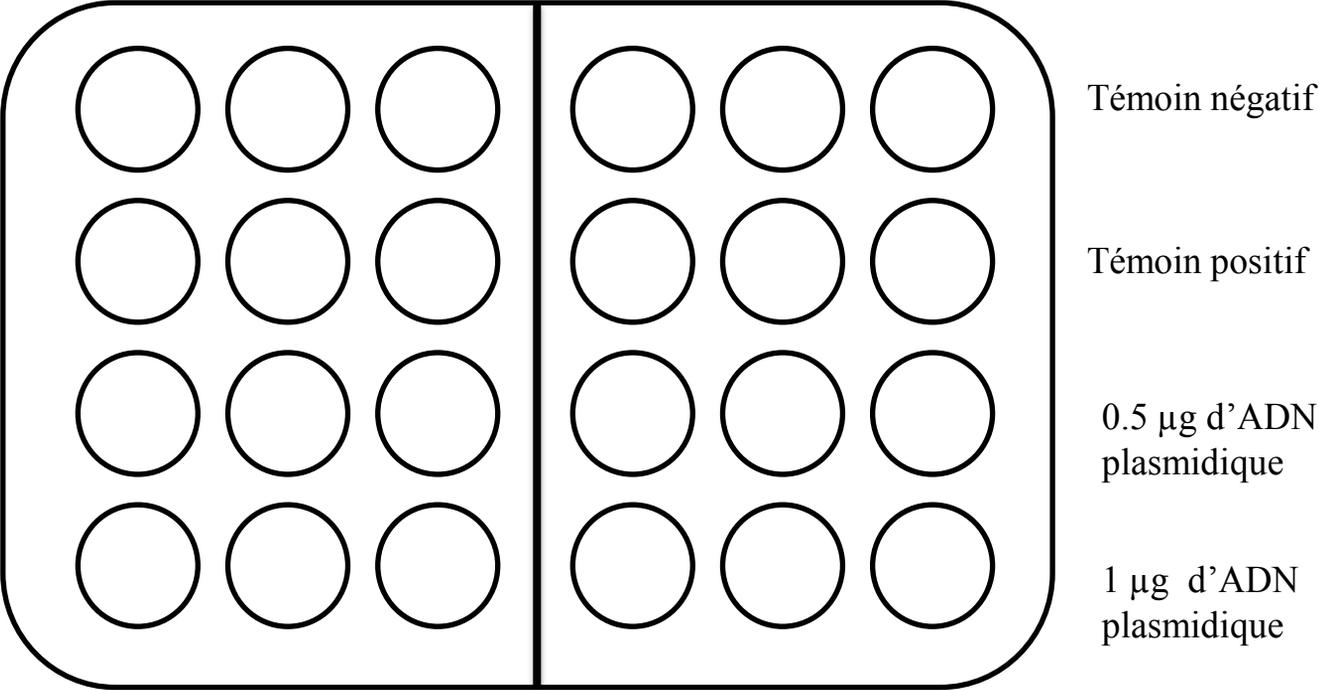


Figure n°28 : Schéma des plaques utilisées lors de la transfection



Non stimulé

Stimulé à l'acide oléique



Le nombre de cellules par puits varient en fonction des plaques (20000, 40000 ou 60000 cellules par puits)

III- Transfection d'ADN plasmidique dans des cellules de mammifère

1) Préparations préliminaires

a) Midi-préparation (figure n°27)

Afin de récupérer le plasmide en grande quantité, on effectue une MidiPrep (**protocole IV - 2**). Pour cela, on récupère les bactéries contenant le clone que l'on a sélectionné, on les resuspend dans un tampon contenant de l'ARNase afin de catalyser la dégradation des ARN, puis on éclate les membranes bactériennes avec un tampon de lyse pour récupérer les plasmides à l'intérieur, on ajoute un autre tampon afin de faire précipiter les sels. Avant d'ajouter le lysat à la colonne, on le filtre puis une fois que le lysat c'est écoulé dans la colonne et que celle-ci a été lavé, on élué l'ADN plasmidique. Ensuite on le fait précipiter avec de l'isopropanol avant de laver le culot à l'éthanol 70%. On redissout ensuite le plasmide dans de l'eau PCR puis on quantifie le produit obtenu par spectrophotométrie (Nanodrop).

b) Culture des cellules en flask (protocole V - 1)

On souhaite effectuer les transfections dans des cellules COS7 (cellules rénales de chimpanzé). Pour cela, on les cultive dans des flask, avec du SVF (sérum de veau fœtal) et du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant des antibiotiques et une supplémentation en L-Glutamine. Les cellules sont incubées à 37 °C dans une atmosphère contrôlée contenant 5 % en dioxyde de carbone. Les cellules en culture vont alors croître jusqu'à tapisser entièrement le fond de la flask. Pour une culture de cellules de type COS-7, il faudra entre cinq et sept jours pour atteindre 100 % de confluence. Il faut penser à changer le milieu tous les 2 jours car lorsque les éléments nutritifs se raréfient, les cellules commencent à mourir. Pour diluer la culture de cellules adhérentes, il faut les décoller du support plastique avec de la trypsine, puis les remettre en culture dans une nouvelle flask avec du milieu de culture fraîchement préparé (= 1 passage cellulaire).

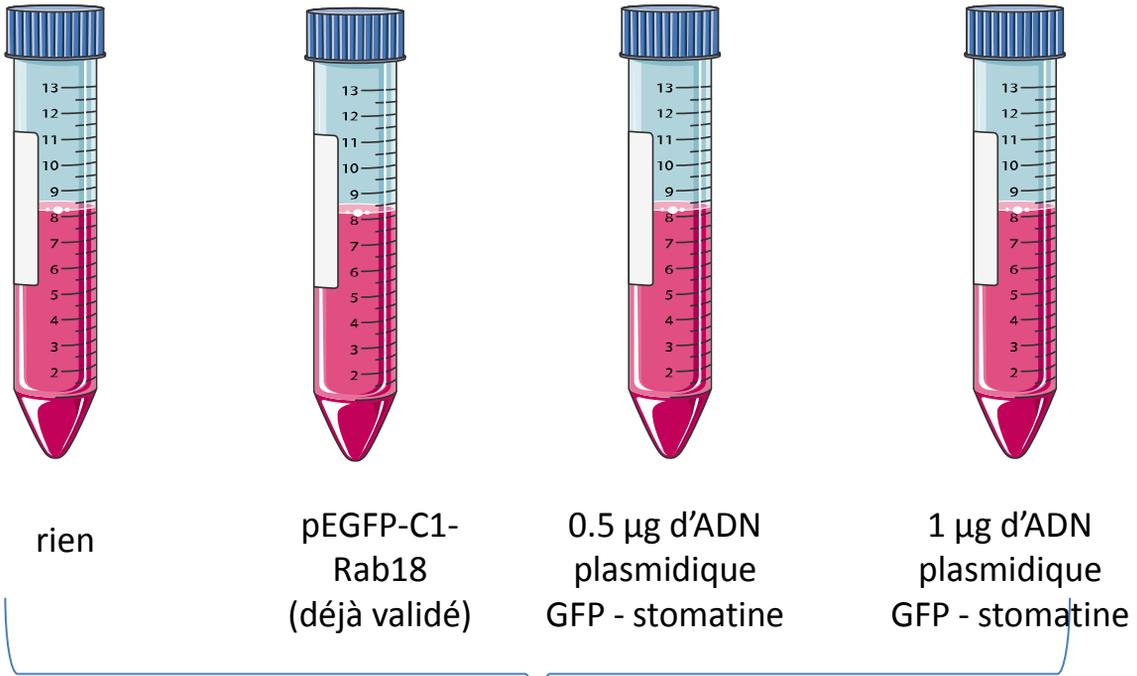
Le milieu appauvri est aspiré à l'aide d'une pipette reliée à une pompe à vide. Les cellules sont lavées avec un tampon phosphate salin appelé PBS (phosphate buffered saline) stérile. Une solution de trypsine est ajoutée afin de décoller les cellules du fond de la flask (laisser agir cinq minutes à 37 °C dans l'incubateur). Ensuite on ajoute du milieu complet (qui va inhiber l'action de la trypsine) et l'on opère des aspirations/ refoulements avec une pipette pour individualiser au maximum les cellules. On poursuit en prélevant un dixième du volume de suspension cellulaire contenue dans la flask, et on les dépose dans une nouvelle flask stérile contenant du milieu DMEM fraîchement préparé. On termine en plaçant la flask dans l'incubateur. (**protocole V - 2**)

c) Mise en plaque (figure n°28)

Lors de la transfection, nous allons tester trois paramètres :

- l'effet de la stimulation à l'acide oléique (acide gras mimant l'apport de lipides exogènes),
- la concentration de cellules par puits,
- et la quantité d'ADN plasmidique par puits.

Figure n°29 : Principe de transfection



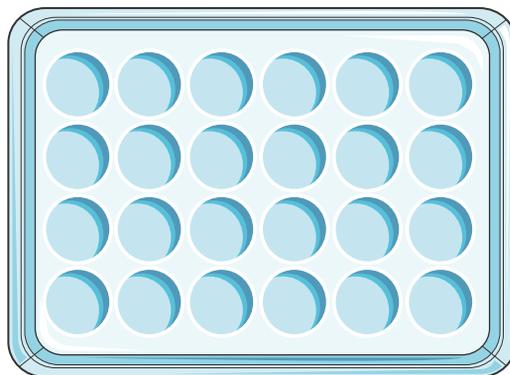
+ milieu DMEM sans antibiotique ni SVF

+ ajout du transfectant

20 min à température ambiante

+ ajout volume/volume de DMEM sans SFV ni antibiotique

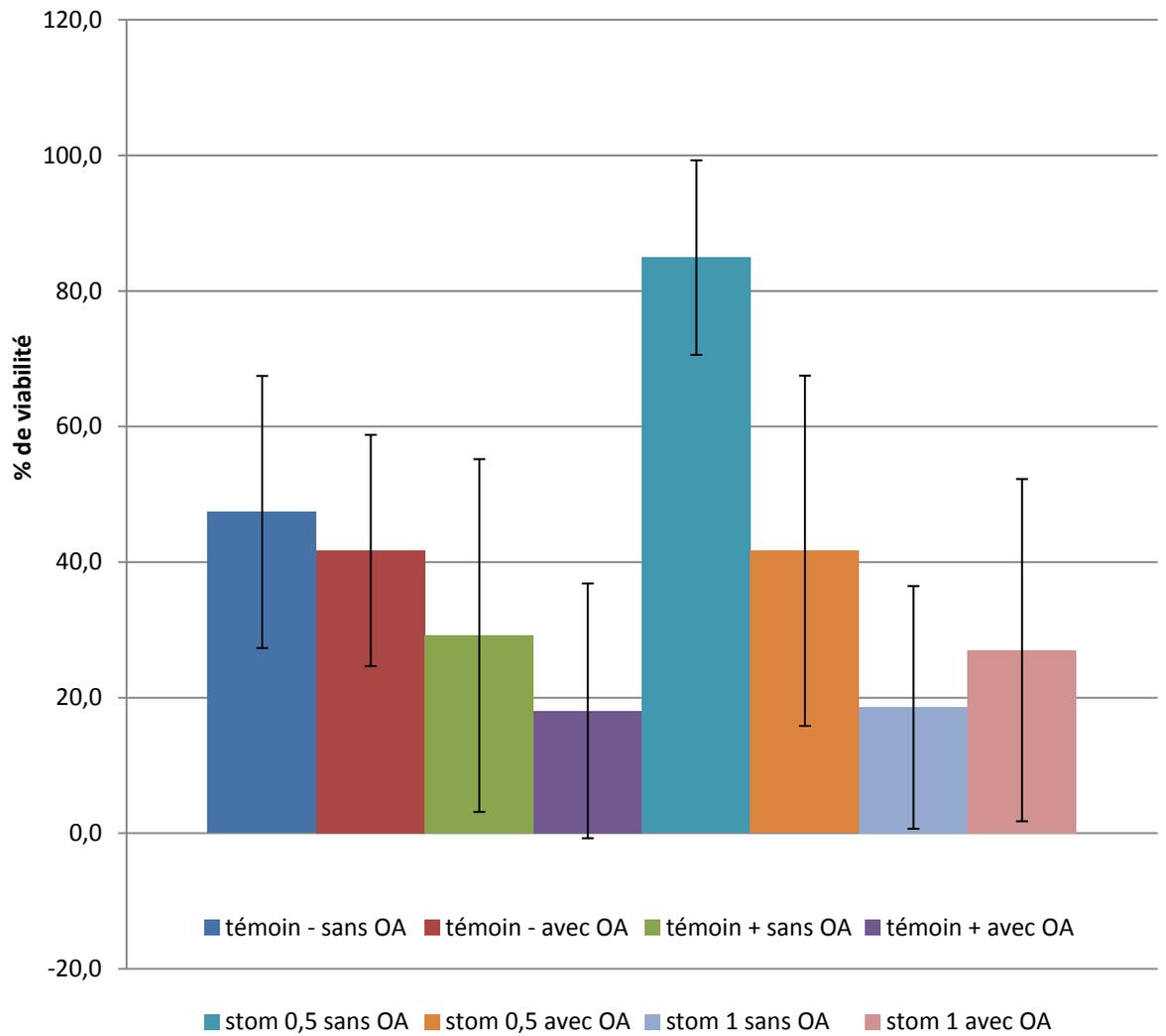
Dépôt dans une plaque 24 puits



Incubation 4h à 37°C

On remplace ensuite le milieu de transfection par du milieu DMEM complet.

Figure n°30 : Etude de la toxicité lors de la transfection



On choisit comme support trois plaques 24 puits : (**protocole V - 1 et VI - 1**)

- Dans une plaque, il y aura 20000 cellules/puits, dans une autre 40000 cellules/puits et dans la dernière 60000 cellules/puits.
- Dans chaque plaque, 12 puits seront stimulés à l'acide oléique et les 12 autres ne le seront pas.
- La première ligne sera le témoin négatif, on ajoutera seulement du milieu complet et l'agent transfectant (Turbofect).
- La deuxième ligne sera le témoin positif, on ajoutera uniquement le plasmide pEGFP-C1 contenant une protéine de fusion déjà validée par ailleurs, GFP-Rab18.
- Dans la troisième ligne, on ajoutera 0.5 µg/puits d'ADN plasmidique codant pour la GFP-stomatine,
- Dans la troisième ligne, on ajoutera 1 µg/puits d'ADN plasmidique codant pour la GFP-stomatine.

2) Principe (figure n°29)

La transfection de cellules consiste en l'introduction d'un fragment d'ADN (en général un plasmide) dans une cellule eucaryote. Les plasmides utilisés sont des vecteurs d'expression eucaryote, codant des protéines s'exprimant dans une cellule eucaryote.

Dans un premier temps, on prépare un tube avec du milieu sans SVF ni antibiotiques en y ajoutant soit l'ADN plasmidique (plasmide pEGFP-C1 + cDNA de la Stomatine), soit le plasmide pEGFP-C1-Rab18 (témoin positif), ou pas d'ADN plasmidique du tout. On ajoute ensuite dans chaque tube le transfectant (Turbofect, 2 µl par µg d'ADN plasmidique)). On laisse incubé 20 minutes à température ambiante puis on ajoute volume à volume du milieu DMEM sans SVF ni antibiotiques dans chaque tube. On dépose 200 µL de chaque solution dans chaque puits, on laisse ensuite incubé 4 h à 37°C avant de remplacer le milieu de transfection par 500 µL de milieu DMEM complet. (**protocole VI - 2**)

3) Résultats et interprétations

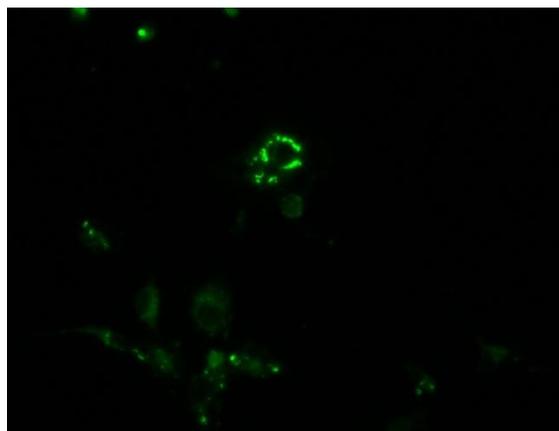
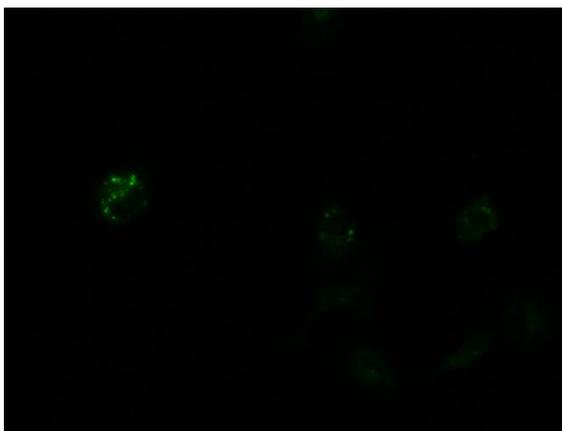
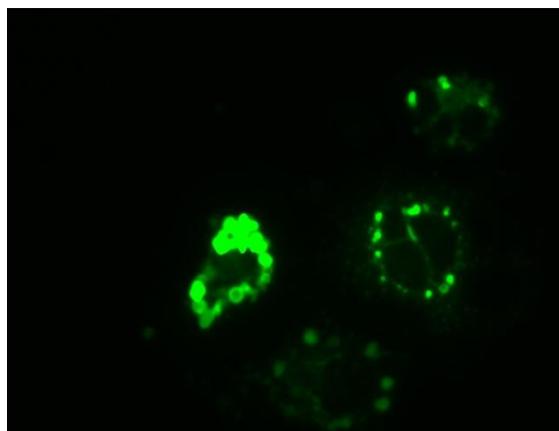
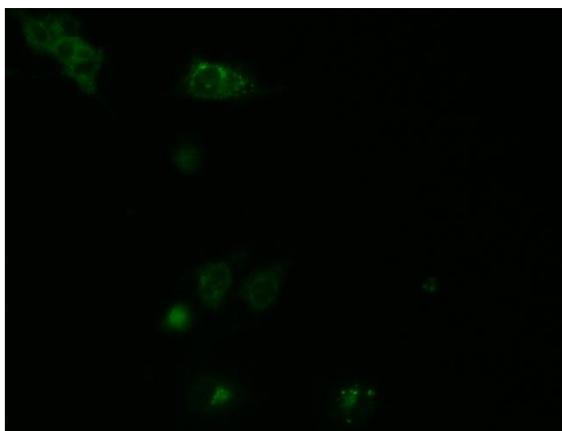
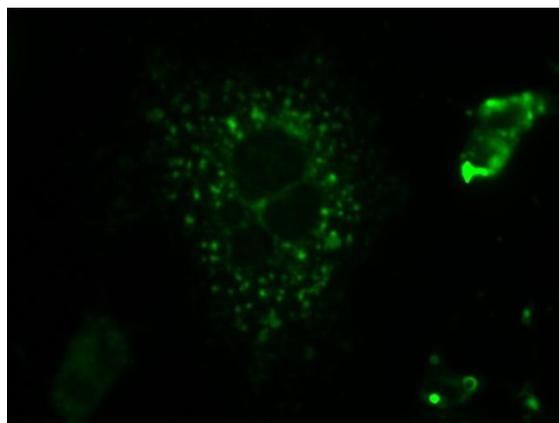
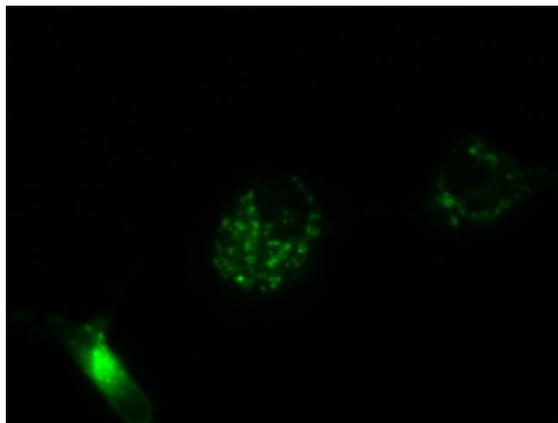
Nous n'avons observé aucune fluorescence sur notre témoin négatif (condition Turbofect seul), ce qui correspond bien au résultat attendu (absence de protéine de fusion GFP-stomatine).

Par contre, nous avons observé de la fluorescence dans notre témoin positif (cellules transfectées par le plasmide GFP-Rab18 déjà validé auparavant). Un signal de fluorescence a également été observé dans les cellules transfectées par le plasmide GFP-Stomatine (0.5 et 1 µg). La viabilité cellulaire est très faible dans les plaques avec 20000 et 40000 cellules par puits et il a été impossible de réaliser une numération cellulaire. La viabilité cellulaire est plus grande dans les cellules transfectées avec 0.5 µg d'ADN plasmidique qu'avec 1 µg.

Donc on a pu uniquement compter les cellules dans la plaque à 60000 cellules par puits (**figure n°30**), on remarque que pour le témoin négatif le taux de viabilité n'atteint pas les 50%, on peut en déduire que le transfectant a une action toxique sur les cellules à ce ratio nombre de cellules/quantité de transfectant. Donc, pour optimiser les prochaines manipulations, il faudrait réduire la concentration de transfectant Turbofect dans ces conditions de culture (plaque 24 puits).

Dans le témoin positif, on constate l'effet de l'acide oléique : en effet il y a plus de gouttelettes lipidiques lorsque les cellules sont stimulées. Toutefois, on remarque aussi un taux de mortalité plus élevé ainsi que des cellules en souffrance. Pour les prochaines manipulations il faudra diminuer la concentration en acide oléique et augmenter le nombre de cellules par puits.

Figure n°31 : Observation microscopique des cellules transfectées



Stimulation à l'acide oléique

Absence de stimulation

Lorsque l'on observe les cellules contenant 0.5 µg d'ADN plasmidique non stimulé à l'acide oléique et celles qui sont stimulées (**figure n°31**), on n'observe très peu de différence, en effet le nombre de gouttelettes lipidiques ne semblent pas beaucoup varier. Cependant on peut conclure que la transfection a bien marché (présence de fluorescence). Il faudra extraire les protéines des cellules transfectées et réaliser un western blot avec l'anticorps anti-stomatine (déjà validé lors du premier stage) pour conclure définitivement quant à la présence du rtansgène dans les cellules COS-7.

Conclusion scientifique :

Les différents objectifs que nous souhaitons valider au cours de ce stage ont été réalisés. En effet, nous avons créé une protéine de fusion GFP-stomatine en clonant la stomatine dans le vecteur d'expression de cellules de mammifères pEGFP-C1.

Le transgène codant pour la protéine de fusion GFP-stomatine a été validé grâce à de nombreux séquençages qui nous ont permis de vérifier que la séquence de la stomatine contenue dans la protéine de fusion est strictement identique à celle de la séquence de la stomatine de référence.

Nous avons donc pu transfecter dans des cellules COS-7, un modèle cellulaire préalablement validé pour notre étude des gouttelettes lipidiques, ce plasmide codant pour la protéine de fusion GFP-stomatine.

Grâce à la microscopie de fluorescence, nous avons pu déterminer que la transfection a fonctionné même si la manipulation doit encore être optimisée (amélioration de la viabilité cellulaire). On observe une expression de la GFP, ce qui confirme la présence d'une protéine GFP, pour autant cela ne nous permet pas de valider que la séquence liée à la GFP soit celle de la stomatine.

Cependant, on sait que la stomatine est liée aux gouttelettes lipidiques et nous avons constaté que dans les cellules COS-7 transfectées, il y a une fluorescence au niveau des gouttelettes lipidiques, on peut donc supposer que la séquence liée à la GFP correspond bien à celle de la stomatine.

Il nous reste cependant encore à optimiser la transfection ainsi que la stimulation des cellules avant de pouvoir commencer les manipulations de mutation de certains acides aminés de la stomatine afin d'évaluer l'effet de cette mutation sur la fonction de la protéine dans notre modèle cellulaire d'étude.

Conclusion personnelle :

Ce stage de huit semaines réalisé à l'INRA fut l'une de mes premières expériences dans ce domaine. Il m'a été très enrichissant, que ce soit sur le plan personnel ou sur le plan professionnel. En effet, il m'a permis de me plonger pleinement dans la vie d'un laboratoire de recherche, d'en découvrir son fonctionnement ainsi que l'organisation du travail d'un technicien.

Sur le plan pratique, j'ai pu mettre en œuvre des techniques jusque là uniquement abordées en cours, ce qui m'a permis d'en comprendre totalement les applications. J'ai également mis en pratique de nombreuses techniques comme le clonage moléculaire et la transfection cellulaire. Le grand nombre de manipulations que j'ai effectuées durant mon stage m'ont aidée à mieux m'organiser et à mieux gérer mon temps.

Les difficultés rencontrées, notamment lors des clonages et du séquençage m'ont permis de mieux comprendre les problèmes techniques et la façon de rebondir lorsque les résultats d'une expérience ne sont pas ceux attendus (par exemple, dessin d'un nouveau couple d'amorces plus en amont du transgène sur la partie C-terminale de la GFP pour optimiser le séquençage)

Ce stage a confirmé mon goût pour les manipulations, mon désir d'apprendre de nouvelles techniques et cette deuxième expérience me conforte dans l'idée de poursuivre mes études dans cette voie.

ANNEXE :

I- Préparation de l'insert pour le clonage

1) Préparation du mix de PCR :

5 µl	buffer colorless 5X
0,25 µl	dNTP 10mM
1,5 µl	MgCl ₂ 25mM
1,25 µl	forward primer (10µm)
1,25 µl	reverse primer (10µm)
0,625 µl	GoTaq
14,5 µl	H ₂ O
1µl	template ADN
25,375	µl final

2) Paramètre de la PCR :

dénaturation initiale	95 °C pendant 5 min	} 40 cycles
Dénaturation	95°C pendant 30s	
hybridation amorces T _m	65 °C pendant 30s	
élongation	72°C pendant 1 min	
élongation finale	72°C pendant 5 min	

3) Vérification sur gel :

On fabrique un gel à 1 % avec un tampon TBE 0.5X + 2 µL de BET, on y dépose 5 µL de marqueur exactladder DNA PreMix 2 log et 5 µL pour chaque échantillon.

4) Amorce utilisé pour la PCR

En 5' : STOMcDNA_XHO_5'

TTTTCT CGA GCT **ATG TCT GAC AAG CGG CCA GC**

En 3' : STOMcDNA_ECORI_3'

TTTT GAA TTC **TCA CTG TTT TGG CCC CAT GAT AG**

Coupure XHOI :

5' C↓T C G A G 3'
3' G A G C T↑C 5'

Coupure EcoRI :

5' G↓A A T T C 3'
3' C T T A A↑G 5'

5) Extraction sur gel

Dans un premier temps, on coule un gel d'agarose à 1% contenant 10 μ L de SyBrGreen. On y dépose 10 μ L de marqueur dans un puits et dans deux autres puits on dépose notre produit de PCR avec du tampon de charge 6X.

On laisse migrer à 100V, puis sur une plaque LED on découpe la bande d'intérêt de la stomatine à 855pb.

Ensuite avec le kit NucleoSpin Extract II, on purifie le produit de PCR de la stomatine. Pour cela :

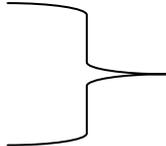
- Ajouter de 200 μ L de tampon NT / 100 mg, puis chauffer à 50°C pendant 10 minutes
- Déposer ce volume sur une colonne du kit et centrifuger 1 min à 11000 g
- Vider le tube, laver la colonne par 600 μ L de tampon NT3 contenant de l'éthanol puis centrifuger 1 min à 11000 g
- Vider le tube, afin de n'avoir que le produit de PCR (ADN double brin) sur la colonne ; on centrifuge encore une fois 2 min à 11000 g

On dépose la colonne dans un microtube de 1.5 mL, et on ajoute 16 μ L d'eau PCR stérile, on laisse reposer 10 min à température ambiante puis on centrifuge 2 min à 11000 g afin de récupérer l'éluat contenant le cDNA de la stomatine.

II- Protocole : amplification bactérienne

1) Préparation d'une préculture (sous PSM)

5 mL de LB
5 μ L de Kanamycine
quelques bactéries



à incuber toute la journée à 37°C sous agitation 250 rpm

2) Amplification de la préculture

Puis on verse les 5 ml dans 200 mL de LB + 200 μ L de Kanamycine dans un erlen avec le bouchon dévissé, incubation toute la nuit à 37°C sous agitation de 250 rpm.

On prélève 500 μ L de culture le lendemain auquel on ajoute 500 μ L de glycérol, avant de congeler à -80°C (permet de revivifier la souche plus facilement pour une mise en culture). On placera le reste de l'erlen au réfrigérateur à 4°C.

III- Clonage du cDNA de la Stomatine dans pEGFP-C1

1) Restriction enzymatique

a) Création d'un insert

10 μ L de produit PCR purifier du cDNA de la stomatine
4 μ L d'H₂O
2 μ L de BSA 10X
2 μ L de tampon NEB 10X
1 μ L de XhoI
1 μ L de EcoRI
Au thermocycler à 37 °C pendant 9 heures

b) Création d'un vecteur

1 µL de plasmide pEGFP-C1
27 µL d'H₂O
4 µL de BSA 10X
4 µL de tampon NEB 10X
2 µL de XhoI
2 µL de EcoRI
Au thermocycler à 37 °C pendant 9h

c) Purification du vecteur et/ou de l'insert avec le kit NucleoSpin Extract II

On ajoute 200 µL de NT dans le microtube. Puis on verse le volume de NT + volume de vecteur ou insert dans la colonne. On centrifuge 1 min à 11000 g avant de vider le tube et d'y ajouter 600µL de tampon NT3 contenant de l'éthanol à la colonne puis centrifuge 1 min à 11000 g. Afin d'enlever tout le liquide, on centrifuge encore une fois 2 min à 11000 g. On dépose la colonne dans un microtube de 1.5 mL, et on ajoute 12 µL d'eau PCR stérile, on laisse reposer 10 min à température ambiante puis on centrifuge 2 min à 11000 g afin de récupérer l'éluat contenant le vecteur ou l'insert.

2) Ligature

$$\text{Quantité insert (ng)} = \frac{100 \text{ ng vecteur} * \text{taille de l'insert}}{\text{taille du vecteur}} * 3$$
$$\text{Quantité insert (ng)} = \frac{100 * 0.850}{4.7} * 3 = 55 \text{ ng}$$

V _{H₂O}	7.8 µL	/
V _{tp 10X}	2 µL	/
V _{insert}	7.2 µL	55 ng
V _{vecteur}	2 µL	100 ng
V _{ligase T4}	1 µL	/

On purifie le produit de la ligation avec le kit NucleoSpin Extract II.

3) Transformation

On dépose 2µL de l'insert + vecteur purifié dans un tube en plastique à fond rond puis on y ajoute 50 µL de bactéries compétentes à déposer délicatement sur la goutte avant de placer 30 min en glace puis d'effectuer un choc thermique : 45 secondes à 42 °C (bain-marie) et 2 min en glace. On ajoutera ensuite 450 µL de SOC medium (à préchauffer à 37 °C), on laissera le tout sous agitation continu à 225 rpm pendant 1h à 37 °C. Avant de les étaler sur des boîtes de LB agar + kanamycine 100X avec des volumes différents (50, 100, et 250 µl), puis incubé 24 heures à 37°C.

4) Prélèvement des colonies

Des colonies ont poussé sur nos boîtes de LB agar + Kanamycine, donc toutes les colonies présentes ont forcément incorporé le plasmide résistant à la kanamycine, mais on ne sait pas si elles ont le cDNA de la stomatine.

On prélève donc plusieurs demi-colonies que l'on numérote bien sur le dos de la boîte, on les resuspend dans 10 μL d' H_2O , ensuite on lyse les bactéries (95 $^\circ\text{C}$ pendant 10 min) afin de libérer l'ADN plasmidique.

5) Envoi au séquençage

Préalablement il faut effectuer une amplification par PCR sur les bactéries lysées.

On dilue les échantillons pour qu'ils soient à 10 ng/ μL .

On envoie 15 μL d'échantillon pour chaque réaction de séquençage, et 200 μL d'amorce diluée au 10 μM .

Le mieux est d'envoyer au séquençage un ou des échantillons, avec une amorce sens et une amorçantisens pour couvrir l'ensemble de la séquence à analyser.

On aligne les séquences avec la séquence de la stomatine de référence et on garde les clones qui correspondent exactement avec cette séquence de référence.

IV- Préparation des clones pour la transfection

1) Minipréparation : préparation d'ADN plasmidique venant d'une culture bactérienne

On transfère 0,5 à 2 mL de culture bactérienne (après une nuit de culture) dans un microtube de 1.5 ou 2 mL.

On centrifuge 1 minute à vitesse maximum pour obtenir un culot de cellules, et on enlève le plus possible de surnageant.

Resuspendre les cellules dans 250 μL de solution A et on vortexe.

On ajoute 250 μL de solution B, on mélange par inversement. NE PAS VORTEXER.

On laisse agir 5 min maximum, avant d'ajouter la solution C, et on mélange 4 à 6 fois.

NE PAS VORTEXER.

On centrifuge 5 minutes à 12000 – 14000 g.

On dépose la colonne dans un tube de 2 mL, puis on transfère le surnageant dans la colonne, on laisse incuber 1 min à température ambiante et on centrifuge 1 minute à 8000g.

On vide le liquide qui s'est écoulé à travers la membrane et on ajoute 750 μL de solution de lavage avant de centrifuger 1 min à 8000g.

On vide l'éluât, et re-centrifuger 3 min à 12000 – 14000 g pour sécher la colonne et enlever tous les résidus d'éthanol.

On place la colonne dans un tube de 1.5 mL et on ajoute 50 μL de solution d'éluât sur le centre de la colonne.

On laisse incuber 1 minutes à température ambiante avant de centrifuger 1 min à 8000g pour éluer l'ADN plasmidique.

2) Midipréparation : purification de plasmide

On centrifuger la culture bactérienne 15 min à 4°C à 6000 g avant de resuspendre le culot de cellules dans 8 ml de Buffer S1 + RNase A.

On ajoute 8 ml de Buffer S2 à la suspension puis On mélange doucement par retournement inverse 6 à 8 fois avant d'incuber 2 à 3 min (max 5 min) à température ambiante. NE PAS VORTEXER.

On ajoute 8 ml de Buffer S3 préalablement refroidi à 4 °C. Immédiatement il faut mélanger le lysat par retournement inverse 6 à 8 fois jusqu'à ce que la solution précipite avant d'incuber 5 min en glace Il faut penser à équilibrer la colonne en ajoutant 2.5 ml de Buffer N2 et laisser la colonne se vider toute seule. LA COLONNE NE DOIT PAS TOUCHER LE LIQUIDE

Pour clarifier le lysat, on utilise une méthode de filtration sous la sorbonne. Pré-mouiller le filtre avec du Buffer N2 et verser le lysat, on récupérera la solution filtrée pour ajouter le lysat clarifié à la colonne et le laisser s'écouler.

On laver la colonne avec 12 mL de Buffer N3 et éliminer le « liquide » puis on élue l'ADN plasmidique avec 5 mL de Buffer N5 à température ambiante.

Avant d'ajouter à température ambiante 3.5 mL d'isopropanol pour faire précipiter l'ADN plasmidique élué (sous sorbonne).

On centrifuger 30 min à 4°C à 15000 g.

Sous sorbonne, on ajoute à température ambiante 2 mL d'éthanol à 70% au culot, puis on centrifuge 10 min à 20 °C à 15000 g .

Il faut enlever le plus possible d'éthanol et laisser sécher le culot 5 à 10 min pour éviter toute trace d'éthanol, on le redissout dans de l'eau PCR puis on effectue un dosage au nanodrop.

V- Culture cellulaire

1) Mise en culture

a. Flask

On ajoute les cellules décongelées (1mL) à 9 mL de milieu DMEM (10% de SVNN, 1% de pénicilline- streptomycine, 1% de L-glutamine) avant de centrifuger 5 minutes à 1000 tours/minute (rpm).

On vider le surnageant et on récupère le culot dans 10 mL de milieu complet.

On ajoute ces 10 mL de suspension cellulaire à 15 ml de milieu complet dans une flask.

Avant d'incuber la culture cellulaire dans une étuve à 37°C et contenant une atmosphère à 5% de CO₂.

b. Plaque 24 puits

On dépose le nombre de cellules voulu soit 20000, 40000 ou 60000 cellules dans 1 ml de milieu complet par puits.

Puis on incube la culture cellulaire pendant 24h dans une étuve à 37°C et contenant une atmosphère à 5% de CO₂.

On vider le milieu avant d'ajouter 500 µL de DMEM complet frais.

c. Cryotube

On reprendre un culot de 5 millions de cellules dans 900 µL de SVF + 100 µL de DMSO et on le congeler à - 80°C (quelques jours à une semaine), avant de le conserver dans l'azote liquide à plus long terme.

2) Décollement des cellules adhérentes

On observe les cellules au microscope avant d'effectuer 2 lavages au PBS (5 mL de PBS / aspiration-refoulement), et d'ajouter 2 mL de trypsine afin de les décoller. On les place 5 minutes à l'étuve.

On observe les cellules au microscope pour voir si elles se sont bien décollées, avant d'ajouter 8 mL de milieu complet (le SVNN stoppe l'action de la trypsine).

On dissocie les amas cellulaires à la pipette, et on prélève un petit volume dans un eppendorf pour le comptage.

On centrifuge le reste à 1000 tours pendant 5 min avant de retirer le surnageant et de les reprendre dans 10 mL de milieu.

VI- Protocole de transfection Cos 7 avec Turbofect (R0531 Thermo scientific)

1) Préparation des différents mix

a) Référence du transfectant : turbofect

Thermo
SCIENTIFIC

PRODUCT INFORMATION

Thermo Scientific

TurboFect Transfection Reagent

#R0531 1 mL
for *in vitro* transfections

Lot XXXXXXXX Expiry Date MM.YYYY



Introduction

The Thermo Scientific™ TurboFect™ Transfection Reagent is a solution of cationic polymer in water. The polymers and deoxyribonucleic acid (DNA) form compact, stable, positively charged complexes, which protect DNA from degradation and facilitate gene delivery into eukaryotic cells. The transfection reagent is ideal for transfection of primary cells, difficult-to-transfect cells and other types of cells with transfection being possible in the presence or absence of serum. The transfection reagent demonstrates superior transfection efficiency and minimal toxicity when compared to lipid-based or other polymer-based transfection reagents.

www.thermoscientific.com/onebio

Storage: Upon receipt store at 4°C.
Product shipped at ambient temperature.



Made in Lithuania

b) Résultats du nanodrop du clone

Echantillons	ng/μL	260/280	260/230
Clone positif 1	5291	1.88	1.68
Clone positif 2	2844	2.25	1.99

On va choisir le clone positif 1 pour le reste des manipulations, que l'on diluera au 1/10^{ème}.

c) Milieu réactionnel pour la transfection

	Témoin négatif	Témoin positif	Stomatine 0.5 µg	Stomatine 1 µg
V milieu DMEM	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
V transfectant	40 µL	40 µL	20 µL	40 µL
V pEGFP-stomatine	/	/	2 µL	4 µL
V pEGFP-C1-Rab18	/	2.4 µL	/	/
	<u>Vortexer le transfectant au moins 30s avant de le prélever</u>			
	Vortexer 10s et laisser incuber 20min à température ambiante			

2) Protocole de transfection

On remplacer le milieu des P24 par 500µl de DMEM sans Serum, sans antibiotiques/ puits pour adapter les cellules à l'absence de facteurs nutritifs dans le milieu.

A la fin de l'incubation avec les milieux réactionnels de transfection, on ajoute par tube du DMEM sans serum à volume/volume . Il faut bien homogénéiser les tubes.

Avant d'aspirer le milieu des puits correspondant et d'y déposer 200µl de milieu réactionnel par puits Il ne faut pas aspirer plus de 12 puits à la fois pour que les cellules ne restent pas trop longtemps sans milieu.

On incube 4h à 37°C avant de remplacer les milieux réactionnels de transfection par 500µl de milieu complet.

Pour les puits stimulés à l'acide oléique, on ajoutera 25 µL d'acide oléique dans 475 µL par puits.

On laisse les cellules incuber 48 heures avant observation au microscope de fluorescence.

Bibliographie :

[Umlauf E](#), [Csaszar E](#), [Moertelmaier M](#), Schuetz GJ, Parton RG, Prohaska R (2004) **Association of stomatin with lipid bodies.** *J Biol Chem.* 279(22):23699-709
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15024010>

[Hue-Beauvais C](#), [Chavatte-Palmer P](#), [Aujean E](#), [Dahirel M](#), [Laigre P](#), [Péchoux C](#), [Bouet S](#), [Devinoy E](#), [Charlier M](#). (2011) **An obesogenic diet started before puberty leads to abnormal mammary gland development during pregnancy in the rabbit.** *Dev Dyn.* 240(2):347-56
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21246651>

[Henry C](#), [Saadaoui B](#), [Bouvier F](#), [Cebo C](#). (2015) **Phosphoproteomics of the goat Milk Fat Globule Membrane: new insights into lipid droplet secretion from the mammary epithelial cell.** *Proteomics.* doi: 10.1002/pmic.201400245
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25737190>

[Cebo C](#), [Lopez C](#), [Henry C](#), [Beauvallet C](#), [Ménard O](#), [Bevilacqua C](#), [Bouvier F](#), [Caillat H](#), [Martin P](#). (2012) **Goat α (s1)-casein genotype affects milk fat globule physicochemical properties and the composition of the milk fat globule membrane.** *J Dairy Sci.* 95(11):6215-29.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22921619>

Logiciel utilisé :

Traduire la séquence en protéine : http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa

Aligner et comparer plusieurs séquences : <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Récupérer des séquences : <http://www.uniprot.org/>

Observation de la microscopie à fluorescence : ImageJ et AxioVs40

ABSTRACT :

I did my internship at the Agronomic National Research Institute, in the unit of Animal Genetics and Integrative Biology during eight weeks. I was supervised by Mrs.CEBO in the team of functional Genomics and Physiology of Mammary Gland. She studies the mechanisms of lipids biosynthesis in the mammary gland. The experiments done together aim at characterizing the biological function of the stomatin, a minor protein associated with the lipid droplets.

My supervisor noticed that small milk globules contains more stomatin protein. We would like to understand the biological role of post-translational modifications of stomatin protein (mostly phosphorylation) previously characterized in mammary epithelial cells.

During my internship, I cloned the stomatin in a plasmid vector coding for a fluorescent protein, the GFP (Green Fluorescent Protein). Before to transfection in the COS-7 cells (monkey renal cells), we performed many sequencing experiments to be sure we had the right sequence of stomatin gene. After transfection of GFP-stomatin in cells, we were able to visualize the GFP protein and the localization of the lipid droplets.

This internship allowed me to discover the work in a research laboratory. I used specific equipment such as a fluorescence microscope and met a lot of researchers. These two months have been very profitable and confirm my desire to work in a research laboratory. I'm really grateful for the confidence which was granted to me and thank the whole team for their hospitality.